

Emílio Mateus Costa Melo

**Indução à tetraploidia e desempenho zootécnico de ostras  
*Crassostrea gigas* (thunberg 1793) triploides em Santa Catarina**

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Aquicultura do Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal de Santa Catarina como requisito parcial para a obtenção do título de Doutor em Aquicultura

Orientador: Dr. Claudio Manoel Rodrigues de Melo  
Coorientadora: Dr<sup>a</sup>. Simone Sühnel

Florianópolis  
2016

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,  
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

MELO, EMILIO

Indução à tetraploida e desempenho de ostras (*Crassostrea gigas*) triploides em Santa Catarina / EMILIO MELO ; orientador, CLAUDIO MELO ; coorientadora, SIMONE SÜHNEL. - Florianópolis, SC, 2016.

94 p.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências Agrárias. Programa de Pós Graduação em Aquicultura.

Inclui referências

1. Aquicultura. 2. Poliploidia. 3. Crescimento. 4. Sobrevivência. 5. Histologia. I. MELO, CLAUDIO. II. SÜHNEL, SIMONE. III. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Aquicultura. IV. Título.

**Indução à tetraploidia e desempenho zootécnico de ostras  
*Crassostrea gigas* (Thunberg 1793) triploides em Santa Catarina**


Por

EMÍLIO MATEUS COSTA MELO


Esta tese foi julgada adequada para a obtenção do título de

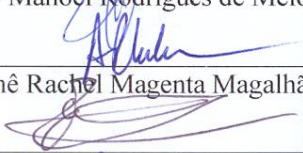
**DOUTOR EM AQUICULTURA**

e aprovada em sua forma final pelo Programa de  
Pós-Graduação em Aquicultura.

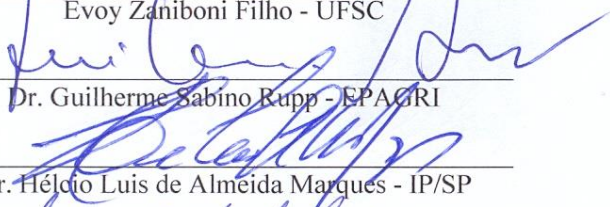
  
\_\_\_\_\_  
Prof. Alex Pires de Oliveira Nuñez, Dr.  
Coordenador do Programa

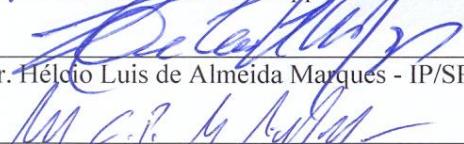
Banca Examinadora:

  
\_\_\_\_\_  
Dr. Claudio Manoel Rodrigues de Melo – *Orientador*

  
\_\_\_\_\_  
Dra. Aimê Rachel Magenta Magalhães - UFSC

  
\_\_\_\_\_  
Evoy Zaniboni Filho - UFSC

  
\_\_\_\_\_  
Dr. Guilherme Sabino Rupp - EPAGRI

  
\_\_\_\_\_  
Dr. Hélio Luis de Almeida Marques - IP/SP

  
\_\_\_\_\_  
Dr. Marcos Caivano Pedroso de Albuquerque - UFSC



Este trabalho é dedicado a minha  
família, em especial a minha querida  
mãe e a minha esposa.



## AGRADECIMENTOS

Inicialmente gostaria de agradecer a minha querida mãe que sempre se empenhou para educar da melhor maneira possível seus quatro filhos com uma dedicação invejável. Sempre incentivando a educação dentro e fora de casa, um grande exemplo a ser seguido por sua garra e determinação para com seus filhos.

À minha esposa que me incentiva com seu exemplo de dedicação à família, ao trabalho e ao seu amor que me impulsiona a seguir em frente.

Aos meus irmãos, sobrinhos e cunhados que sempre me alegraram e me incentivaram a buscar meus sonhos, não importando onde eles estejam.

Ao meu orientador, Claudio Manoel Rodrigues de Melo, que sempre buscou me ajudar nas necessidades apresentadas ao longo do mestrado e doutorado, possibilitando que este trabalho fosse realizado.

À minha coorientadora Simone Sühnel, por toda ajuda na fase final da elaboração da tese, com seus ensinamentos, estímulos e paciência.

A todos os membros da equipe técnica do Laboratório de Moluscos Marinhos: Carlos Henrique, Jaqueline, Eduardo, Sino, Zezé, Bê, Alexandre, Marisa, Claudio Blacher, Ricardo, Itamar, Josué, em especial à técnica Redina por toda ajuda durante os cultivos de campo e ao chefe de produção Francisco Carlos da Silva por seus ensinamentos, ajuda e incentivo à nossa pesquisa. Aos amigos do laboratório, Cássio, Renata, Patrick, Gabriel e a todos que de alguma forma contribuíram para a conclusão desse estudo.

Às alunas de graduação em Engenharia de Aquicultura, Brenda de Oliveira e Ana Cristina, pela ajuda no experimento de campo e no experimento de histologia. À zootecnista Gabriela Costa Bachi pela ajuda nas análises histológicas.

Ao Laboratório Nepaq, pela disponibilidade para realização das análises histológicas em especial à técnica Ana Lúcia.

Ao CIRAM pela disponibilização da imagem da localização dos cultivos.

Ao Laboratório Blue Water Aquaculture, pelo empréstimo do citômetro de fluxo para as análises da ploidia dos animais do estudo.

Ao Vinícius, proprietário da Fazenda Marinha Paraíso das Ostras, por toda ajuda fornecida ao longo de 3 anos de experimentos de cultivo, fornecendo a estrutura e a mão de obra para elaboração do estudo. E ao funcionário Juliano, por toda ajuda fornecida nos momentos das biometrias.





## RESUMO

O estudo teve como objetivos a produção de ostras do Pacífico (*Crassostrea gigas*) tetraploides, utilizando choques de indução com 6-dimetilamino-purina (6-DMAP) e térmico (25-36° C), em substituição à citocalasina-B (CB), em embriões diploides, no momento da saída do primeiro corpúsculo polar. Além disso, o estudo buscou um melhor entendimento sobre o desempenho zootécnico obtido com o cultivo de ostras triploides em diferentes locais nas Baías Norte e Sul da ilha de Santa Catarina, avaliando parâmetros como peso fresco total, altura e sobrevivência (experimentos I, II e III) e ainda aspectos reprodutivos, como índice de condição e histologia desses organismos quando expostos às condições de cultivo no sul do Brasil. Os resultados obtidos com a indução a tetraploidia em ostras do Pacífico foram promissores, obtendo-se larvas tetraploides em todos os tratamentos testados, sendo indicada a substituição da CB pelos outros tratamentos (6-DMAP e temperatura). Na análise de desempenho zootécnico de ostras triploides, em ambos os experimentos as ostras triploides mostraram melhores resultados que às ostras diploides em peso fresco total e altura no período de verão. Quanto a sobrevivência, as ostras triploides foram superiores às ostras diploides apenas no experimento I, não havendo diferença estatística ao final dos experimentos II e III. Já as análises dos índices de condição de ostras triploides apresentaram um padrão semelhante ao encontrado para ostras diploides, apresentando os maiores valores durante o mês de agosto de 2015 e os menores em fevereiro de 2016 para ostras 2N e 3N em ambos locais de cultivo. Já na histologia, as ostras 3N apresentaram um padrão semelhante às ostras 2N quanto ao ciclo reprodutivo, indicando que as potenciais melhorias encontradas para ostras 3N no Brasil não estão ligadas apenas à diminuição da atividade reprodutiva desses organismos e sim a outros fatores que precisam ser avaliados em posteriores estudos.

**Palavras-chave:** Aquicultura, poliploides, crescimento, sobrevivência, histologia.



## ABSTRACT

The study aimed to the production of Pacific oysters (*Crassostrea gigas*) tetraploid, using induction shocks with 6-dimethylamino-purine (6-DMAP) and heat (25-36° C), replacing cytochalasin-B (CB) in diploid embryos, the output of the first polar body. In addition, the study sought a better understanding of the growth performance achieved by growing triploid oysters at different locations in the bays north and south of the island of Santa Catarina, evaluating parameters such as the total fresh weight, height and survival (experiment I, II and III), and even reproductive aspects, as a condition index and histology of these organisms when exposed to growing conditions in southern Brazil. The results obtained with the induction tetraploidy in Pacific oysters were promising, yielding tetraploid larvae in all treatments, with the substitution indicated by CB other treatments (6-DMAP and temperature). In the production performance analysis of triploid oysters, in both experiments triploid oysters were higher than diploid oysters in the total fresh weight and height in the summer period. As for survival, the triploid oysters were higher than diploid oysters only in experiment I, with no statistical difference at the end of the experiments II and III. As for the analysis of the index condition of triploid oysters showed a pattern similar to that for diploid oysters, with higher rates during the month of August 2015 and the lowest in February 2016 for 2N and 3N oysters in both cultivation sites. As for histology, the 3N oysters showed a pattern similar to 2N oysters on the reproductive cycle, indicating that potential improvements found for 3N oysters in Brazil are not linked just to decreased reproduction of these organisms but the other factors that need to be evaluated in later studies.

Keywords: Aquiculture, polyploid, growth, survival, condition index, histology.



## LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Localização dos pontos para avaliação do desempenho zootécnico de ostras diploides e triploides. BN=Baía Norte e BS=Baía Sul .....	28
--	----

### ARTIGO I

Figura 1. Análise de citometria de fluxo para larvas com 48h de idade, resultante do bloqueio do primeiro corpúsculo polar, 14min. após a fertilização.....	37
---	----

### ARTIGO II

Figura 1. Localização dos pontos de instalação das unidades experimentais para os três experimentos de avaliação do desempenho zootécnico de ostras diploides e triploides. BN=Baía Norte e BS=Baía Sul .....	47
---	----

Figura 2. Peso vivo total (g) para ostras nos tratamentos diploides (2N) e triploides (3N), cultivadas nos locais da Baía Norte (BN) e na Baía Sul (BS). Experimentos I (A), II (B) e III (C) .....	62
---	----

Figura 3. Altura (mm) das ostras nos tratamentos diploides (2N) e triploides (3N), cultivadas nos locais da Baía Norte (BN) e na Baía Sul (BS). Experimentos I (A), II (B) e III (C) .....	63
--	----

Figura 4. Sobrevivência (%) de ostras nos tratamentos diploides (2N) e triploides (3N), cultivadas nos locais da Baía Norte (BN) e na Baía Sul (BS). Experimentos I (A), II (B) e III (C) .....	64
---	----

### ARTIGO III

Figura 1. Localização dos pontos de instalação das unidades experimentais para os três experimentos de avaliação do desempenho zootécnico de ostras triploides. BN=Baía Norte e BS=Baía Sul .....	68
---	----

Figura 2. Índice de Condição (IC) médio das ostras diploides (2N) e triploides (3N), cultivadas na Baía Norte (BN) e Baía Sul (BS), ao longo dos meses de coleta. (d. = idade em dias) .....	75
--	----

Figura 3. Estágios do ciclo reprodutivo observados em ostras diploides (2N), na Baía Sul (BS) e Baía Norte (BN).....78

Figura 4. Estágios do ciclo reprodutivo observados em ostras triploides (3N), na Baía Sul (BS) e Baía Norte (BN).....78

Figura 5. Secções histológicas do tecido gonádico de machos da ostra *Crassostrea gigas* diploides cultivadas. Detalhes do reprodutivo (A) gametogênese; (B) pré-desova; (C) desova; (D) repouso. ct: tecido conjuntivo; eo: espermatogônia; wf: parede do folículo; fo: folículo; sp: espermatozoide; if: espaço intrafolicular; rg: gametas remanescentes. A barra representa 200 µm.....79

Figura 6. Secções histológicas do tecido gonádico de fêmeas da ostra *Crassostrea gigas* diploides cultivadas. Detalhes do reprodutivo (A) gametogênese; (B) pré-desova; (C) repouso. ct: tecido conjuntivo; oo: oogônia; wf: parede do folículo; fo: folículo; oc: oócito; if: espaço intrafolicular; rg: gametas remanescentes. A barra representa 200 µm .80

## LISTA DE TABELAS

### ARTIGO II

Tabela 1. Início dos experimentos, duração, repetições e número de biometrias realizadas .....	48
Tabela 2. Densidade de estocagem, tipo de lanterna e manejo das ostras para cada fase de cultivo nos três experimentos .....	49
Tabela 3. Médias de peso fresco total (g) de ostras <i>Crassostrea gigas</i> para os locais, Baía Norte (BN) e Baía Sul (BS) e para os tratamentos diploides (2N) e triploides (3N) nos experimentos I, II e III.....	50
Tabela 4. Médias de altura (mm) de ostras <i>Crassostrea gigas</i> para os locais, Baía Norte (BN) e Baía Sul (BS) e para os tratamentos diploides (2N) e triploides (3N), nos experimentos I, II e III.....	51
Tabela 5. Médias de sobrevivência (%) de ostras <i>Crassostrea gigas</i> para os locais, Baía Norte (BN) e Baía Sul (BS) e para os tratamentos diploides (2N) e triploides (3N), nos experimentos I, II e III.....	52

### ARTIGO III

Tabela 1. Densidade de estocagem, tipo de lanterna e manejo das ostras para cada fase de cultivo nos três experimentos .....	69
Tabela 2. Descrição histológica dos estágios e das fases do desenvolvimento gonádico no ciclo reprodutivo das ostras do Pacífico <i>Crassostrea gigas</i> , adaptado de Sühnel et al. (2010) .....	72
Tabela 2. Descrição histológica dos estágios e das fases do desenvolvimento gonádico no ciclo reprodutivo das ostras do Pacífico <i>Crassostrea gigas</i> , adaptado de Sühnel et al. (2010) .....	73
Tabela 3. Percentual de ostras triploides, durante o período de verão (análises histológicas) .....	74
Tabela 4. Médias de índice de condição (IC) de ostras <i>Crassostrea gigas</i> para os locais, Baía Norte (BN) e Baía Sul (BS) e para os tratamentos diploides (2N) e triploides (3N).....	76

Tabela 5. Porcentagem e proporção sexual de exemplares de <i>Crassostrea gigas</i> diploides (2N) e triploides (3N) .....	76
---	----



## SUMÁRIO

<b>INTRODUÇÃO GERAL</b> .....	21
I.1 Histórico da atividade de cultivo de ostras <i>Crassostrea gigas</i> (Thunberg 1793) no Brasil .....	21
I. 2 Problemática e Justificativa .....	22
I. 2.1 Poliploidia em ostras .....	23
I. 2.2 Taxonomia e ciclo reprodutivo de <i>Crassostrea gigas</i> .....	26
I. 2.3 Características das áreas de estudo .....	28
<b>I. 3 OBJETIVOS</b> .....	29
I. 3.1 Objetivo Geral .....	29
I. 3.2 Objetivos Específicos .....	29
<b>ARTIGO I. INDUÇÃO À TETRAPLOIDIA EM OSTRAS DO PACÍFICO, <i>Crassostrea gigas</i> (Thunberg 1793)</b> .....	31
1. Introdução .....	32
2. Materiais e Métodos .....	34
2.1 Obtenção dos Animais .....	34
2.2 Obtenção de Gametas e Fertilização .....	34
2.3 Indução à Tetraploidia .....	35
2.4 Avaliação da Ploidia .....	36
2.5 Análise Estatística .....	36
3. Resultados .....	36
4. Discussão .....	38
5. Referências .....	40
<b>ARTIGO II. DESEMPENHO ZOTÉCNICO DE OSTRAS DO PACÍFICO <i>Crassostrea gigas</i>, (Thunberg 1793) TRIPLOIDES EM SANTA CATARINA</b> .....	43
1. Introdução .....	44
2. Materiais e Métodos .....	46

2.1 Localização .....	46
2.2 Obtenção de sementes de ostras diploides e triploides.....	47
2.3 Experimentos .....	48
2.4 Manejo de cultivo.....	48
2.5 Avaliação da Ploidia .....	49
3. Resultados.....	49
3.1 Crescimento em peso fresco total das ostras .....	49
3.2 Crescimento em altura das ostras .....	50
3.3 Sobrevivência.....	51
4. Discussão .....	52
4.1 Crescimento em peso fresco total e altura.....	53
4.2 Sobrevivência.....	55
5. Referências.....	57
Material Suplementar.....	62
Material Suplementar.....	63
Material Suplementar.....	64

<b>ARTIGO III. ASPECTOS REPRODUTIVOS DE OSTRAS</b> <b><i>Crassostrea gigas</i> (Thunberg 1793) TRIPLOIDES CULTIVADAS</b> <b>EM SANTA CATARINA .....</b>	<b>65</b>
1. Introdução .....	66
2. Materiais e Métodos .....	68
2.1 Localização e parâmetro ambiental.....	68
2.2 Obtenção de sementes de ostras diploides e triploides.....	69
2.3 Experimento de cultivo .....	69
2.4 Índice de Condição.....	70
2.5 Histologia .....	70
2.6 Avaliação da ploidia.....	70
2.7 Delineamento experimental e análise estatística .....	71

3. Resultados .....	74
3.1 Fatores Ambientais .....	74
3.2 Análise de Plidia.....	74
3.3 Índice de Condição .....	74
3.4 Histologia .....	76
4. Discussão.....	80
4.1 Índice de Condição .....	80
4.2 Histologia .....	81
5. Bibliografia.....	83
<b>CONSIDERAÇÕES FINAIS.....</b>	<b>87</b>
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS DA INTRODUÇÃO GERAL.....</b>	<b>89</b>



## INTRODUÇÃO GERAL

### I.1 Histórico da atividade de cultivo de ostras (*Crassostrea gigas*, Thunberg, 1793) no Brasil

O Brasil possui inúmeras vantagens para o aumento da produção de pescados a partir da aquicultura, tanto no interior do continente, quanto em sua costa. De acordo com Brasil (2014), o país possui 5,5 milhões de hectares de reservatórios de água doce e uma costa com aproximadamente 8,4 mil quilômetros de extensão, clima favorável, terras disponíveis e um crescente mercado consumidor interno, o que possibilita uma expectativa de crescimento substancial para o futuro da atividade.

A maior produção aquícola brasileira está baseada principalmente na piscicultura continental com um total de 611.343 toneladas. Em segundo lugar encontra-se a carcinocultura com 74.415 toneladas (FAO, 2012). Já a malacocultura (cultivo de moluscos bivalves) ocupa o terceiro lugar na produção nacional com cerca de 20.699 toneladas, sendo estes representados, em escala decrescente de produção, por mexilhões (*Perna perna* Linnaeus, 1758), ostras (*Crassostrea gigas*) e vieiras (*Nodipecten nodosus* Linné, 1758).

De acordo com Melo et al. (2010), a espécie *C. gigas* foi introduzida no Brasil no ano de 1974, pelo Instituto de Pesquisas da Marinha de Cabo Frio-Rio de Janeiro, sendo as sementes importadas da Grã-Bretanha. Nesse primeiro momento foram realizados alguns estudos com essa espécie, mas sem sucesso econômico (FERREIRA e OLIVEIRA, 2007).

Em 1975, o Instituto Estadual de Pesca de São Paulo importou sementes do Japão e iniciou alguns testes de crescimento em Cananéia, São Paulo. Já em 1981, o Instituto de Biologia da Bahia importou novamente sementes da Grã-Bretanha para tentativas de cultivo no nordeste brasileiro. No ano seguinte, em 1982, surge a primeira fazenda produtora de sementes de *C. gigas* em Cananéia, São Paulo. Em 1987, essa espécie é inserida em Santa Catarina a partir da aquisição de sementes providas do Instituto de Investigações Marinhas de Cabo Frio-RJ, para avaliação de seu desempenho zootécnico em campo. Nos anos seguintes, o cultivo de ostras em Santa Catarina continuou utilizando sementes providas de Cabo Frio-RJ, além de importar sementes do Chile e dos EUA e utilizar sementes produzidas pelo Laboratório de Moluscos Bivalves (LMM) da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC). Em 1998 a importação de sementes foi definitivamente proibida no Brasil,

por razões sanitárias (IBAMA Administrative Edict n. 145-n, of October 29, 1998).

Com a produção constante de sementes da espécie *Crassostrea gigas* por parte do LMM-UFSC, a malacocultura comercial brasileira surge, incentivada por trabalhos de pesquisa e extensão realizados, tanto pelo LMM-UFSC quanto pelo apoio da Empresa de Pesquisa Agropecuária e Extensão Rural de Santa Catarina (EPAGRI), como uma alternativa de renda aos pescadores artesanais de Santa Catarina (MELO et al., 2010).

A partir de sua inserção no estado de Santa Catarina, esta espécie apresentou características zootécnicas de grande interesse para a cadeia produtiva, alcançando o tamanho de mercado (7-8cm) a partir de 6 meses de cultivo, fato pouco frequente em outras localidades no mundo (OLIVEIRA, 2005). Atualmente, a produção de ostras no estado de Santa Catarina vem crescendo gradativamente como mostram os dados da EPAGRI (2015), alcançando o recorde da produção no ano de 2014 no Brasil, com um total produzido de 3.670 toneladas, correspondendo a mais de 90% do total produzido no País (BRASIL, 2014).

Apesar do grande desempenho zootécnico alcançado por essa espécie (*C. gigas*) no Brasil, alguns problemas foram surgindo com o passar dos anos. Dentre eles, podemos citar principalmente a ocorrência de mortalidade de verão (EPAGRI, 2015) e a falta de um produto de qualidade nos meses de maior demanda durante o verão, devido aos processos de maturação e desova dos organismos normais (diploides) (NELL, 2002).

## I. 2 Problemática e Justificativa

A síndrome da mortalidade de verão em ostras é conhecida e relatada desde a década de 1940 no Japão e vem sendo identificada em vários países como a França (GOULLETQUER et al., 1998; GAGNAIRE et al., 2006), Estado Unidos (CHENEY et al., 2000) e Irlanda (SAMAIN e McCOMBIE, 2008). Maturação gonádica, as práticas de manejo, o aumento da temperatura da água do mar, a presença de agentes patogênicos ou poluentes, são fatores que interferem na intensificação da mortalidade de verão (GOULLETQUER et al., 1998). Como os eventos de mortalidades ocorrem principalmente durante o período de verão, alguns autores acreditam que tais mortalidades estejam relacionadas ao período reprodutivo das ostras *Crassostrea* (GAGNAIRE et al., 2006, GOULLETQUER et al., 1998).

Duchemin et al. (2007), comparando a variação sazonal dos parâmetros imunes em ostras (*Crassostrea gigas*) diploides e triploides, cultivadas na França entre 2003 e 2004, observaram que as ostras triploides respondem menos a estímulos ambientais do que as ostras diploides e, por isso seriam mais tolerantes durante o período de verão. Esse estudo também correlacionou o sistema imune ao sistema reprodutivo de moluscos bivalves, encontrando forte relação entre eles.

Com a redução da gametogênese observada em ostras triploides, estas poderiam ser comercializadas durante o período reprodutivo, com melhorias na qualidade de carne desses organismos, quando comparados às ostras diploides. Por esse motivo as ostras triploides são cultivadas na França desde a década de 1990, representando uma alternativa para melhoria do cultivo de ostras nessa região, sendo elas conhecidas na França como “ostras das quatro estações” (JOUAUX et al., 2010).

A importância da produção de ostras triploides (*Crassostrea gigas*) em Santa Catarina está diretamente ligada a três aspectos principais, sendo eles a melhoria na qualidade da carne (principalmente na manutenção de altos níveis de glicogênio na carne durante o período de verão), a disponibilidade de um produto com alta qualidade durante todo ano e ainda na possível redução da mortalidade de verão.

Com o sucesso na produção de organismos triploides no Brasil alcançado apenas no ano de 2015, nenhum estudo de avaliação de desempenho zootécnico foi realizado até o momento.

### I. 2.1 Poliploidia em ostras

Os organismos poliploides podem ser definidos como aqueles que possuem um ou mais conjuntos de cromossomos em relação ao que ocorre naturalmente na mesma espécie (PIFERRER et al., 2009). Dentre os mais utilizados para aquicultura, encontram-se os organismos triploides, aplicados ao cultivo e comercialização e os organismos tetraploides, utilizados como reprodutores para obtenção de novos organismos triploides.

Os estudos com indução à triploidia em moluscos bivalves começaram na década de 1980, com a espécie de ostra *Crassostrea virginica*, nos Estados Unidos da América (STANLEY et al., 1981) e se espalharam por vários países do mundo como França (EUDELIN et al., 2000), Austrália (HAND et al., 2004), China (TIAN et al., 1999) e México (VERDUGO et al., 2000).

No Brasil, os primeiros estudos com indução à poliploidia (MELO et al., 2015) ocorreram apenas nos últimos anos, o que proporciona um

vasto campo para pesquisa. A triploidia em ostras, mesmo sendo pouco conhecida no Brasil, sempre esteve entre as demandas dos produtores em relação ao fornecimento de sementes por parte dos laboratórios no sul do país.

Nos dias atuais, a indução à poliploidia tem sido realizada principalmente em ostras *C. gigas* (GAGNAIRE et al., 2006; NORMAND et al., 2009). Porém, se buscou a indução em outras espécies de moluscos bivalves, como as espécies de ostras *Crassostrea virginica* (STONE et al., 2013; SUPAN et al., 2000), *Saccostrea glomerata* (HAND et al., 2004), *Ostrea edulis* (HAWKINGS et al. 1994); de mexilhões, *Mytilus edulis* (BRAKE et al., 2004); vieiras, *Argopecten ventricosus* (VERDUGO et al., 2000) e *Chlamys farreri* (YANG et al., 2000) e em moluscos de areia *Mulinia lateralis* (YANG e GUO, 2006) e *Mercenaria mercenaria* (EL-WAZZAN e SCARPA, 2009)

O objetivo inicial da indução à triploidia era manter as ostras ricas em glicogênio durante todo o ano, visto que, durante o período reprodutivo a qualidade da carne das ostras decai em função dos processos de maturação e desova (ALLEN e DOWNING, 1991). Ainda durante o período de verão, as ostras diploides tornam-se menos apreciadas para o consumo e comercialização em virtude da acentuada redução do nível de glicogênio, devido ao processo de gametogênese (NELL, 2002).

A característica de maior interesse nos organismos triploides está diretamente relacionada à sua baixa capacidade na formação de gametas viáveis para reprodução (PIFERRER et al., 2009; NELL, 2002; MALLIA et al., 2005). Existem inúmeras vantagens que acompanham essa característica, dentre elas estão a maior taxa de crescimento, ganho de peso e sobrevivência em *Crassostrea gigas* (NORMAND et al., 2009; NELL e PERKINS, 2005) e, ainda, em alguns casos a redução de problemas relacionados ao escape de organismos ao ambiente natural (GUO et al., 2002). No entanto, para alguns moluscos bivalves, a triploidia não produz necessariamente uma esterilidade completa e, sim, uma grande redução nos processos reprodutivos, com uma forte redução nos processos de formação de gametas (PIFERRER et al., 2009; JOAUAX et al., 2010).

A qualidade do produto também pode ser alterada com a triploidia. O sabor da ostra está relacionado à sua concentração de glicogênio no tecido mole. De modo geral, ostras magras (pós-desova) ou muito ricas em lipídeos não possuem um sabor apreciado (NELL, 2002). Allen e Downing, 1991, realizaram um estudo de análise sensorial com *Crassostrea gigas* nos Estados Unidos e encontraram que o ideal para os consumidores daquela região são ostras com uma concentração de



glicogênio de médio a alto. Portanto, com a triploidia diminuindo a maturação dos gametas, a qualidade do produto é preservada ao longo de todo ano (NELL, 2002).

A indução à triploidia pode ser realizada de duas formas: indireta e direta. A forma indireta utiliza de indutores físicos ou químicos para a retenção de um dos corpúsculos polares, em gametas fertilizados de reprodutores diploides, produzindo um número inferior a 100% de organismos triploides, sendo estes conhecidos como triploides induzidos (GUO et al., 1996; EUDELIN et al., 2000; NELL, 2002; PIFERRER et al., 2009; MELO et al., 2015). A forma direta consiste no cruzamento entre reprodutores tetraploides e diploides, formando 100% da prole triploides, sendo estes conhecidos como triploides naturais (ALLEN e DOWNING, 1986; PEACHEY e ALLEN, 2016).

Atualmente, o Brasil (LMM-UFSC) possui condições necessárias para realizar induções de forma indireta em ostras (*Crassostrea gigas*) alcançando resultados de até 80% de sucesso à triploidia (MELO et al., 2015). Entretanto, o interesse maior de qualquer laboratório de produção de larvas e semente que buscam a poliploidia em moluscos bivalves é na obtenção de organismos tetraploides. Nesse caso, a reprodução ocorreria sem a necessidade de aplicação de choques de indução, o que facilitaria muito a obtenção de organismos triploides (GUO et al., 1996).

Apesar da baixa capacidade reprodutiva de ostras triploides, alguns autores perceberam ampla variação entre esses organismos, encontrando, em alguns casos, gametas aptos para reprodução (GUO e ALLEN, 1994; PIFERRER et al., 2009; JOAUAX et al., 2010).

A primeira produção de ostras tetraploides ocorreu com a espécie *C. gigas* em 1993, nos Estados Unidos da América, utilizando o cruzamento entre fêmeas triploides com capacidade reprodutiva e machos diploides, seguido do bloqueio do primeiro corpúsculo polar, com a utilização da Citocalasina-B (CB) ( $C_{26}H_{33}O_5$ ) (GUO e ALLEN, 1994). Dentre os aspectos negativos dessa técnica estão a obrigatoriedade da formação de um plantel de reprodutores de ostras triploides para atender a necessidade por oócitos viáveis e, ainda, a utilização de CB, um conhecido agente nocivo, tanto ao ser humano quanto ao meio ambiente (PEACHEY e ALLEN, 2016).

Outra técnica alternativa para produção de ostras tetraploides, que apresenta maior eficiência para *C. gigas*, utiliza o cruzamento entre fêmeas diploides com machos tetraploides, aplicando o choque de indução com CB, durante a saída do segundo corpúsculo polar (GÉRARD et al., 2005). No entanto, devido à falta de organismos tetraploides no Brasil, essa técnica torna-se inviável para as condições nacionais.

A tetraploidia em ostras também pode ser obtida a partir da indução em oócitos de ostras diploides, inibindo a meiose I e/ou II, ou a mitose (BEAUMONT e FAIRBROTHER, 1991). Os índices de tetraploidia alcançados com essa técnica geralmente são baixos. Porém, não há necessidade de formação de reprodutores triploides, sendo esta técnica mais indicada para a indução a tetraploidia em ostras no Brasil. A partir disso, Guo et al. (1996) buscaram demonstrar a viabilidade reprodutiva de *C. gigas* tetraplóides na produção de triploides. Nessa pesquisa comprovou-se que ambos os sexos são capazes de produzir 100% de organismos triploides, quando cruzados com indivíduos diploides. O cruzamento entre organismos tetraplóides produzirão novos reprodutores tetraplóides, garantindo com isso a renovação constante do estoque (GUO e ALLEN, 1994).

## I. 2.2 Taxonomia e ciclo reprodutivo de *Crassostrea gigas*:

A taxonomia da espécie em estudo foi obtida pelo Sistema de Informação Taxonômica Integrado (ITIS, “Integrated Taxonomic Information System”) (<http://www.itis.gov/index/html>):

- Filo: Mollusca;
- Classe: Bivalvia (Linnaeus, 1758);
- Sub-classe: Pteriomorphia (Beurlen, 1944);
- Ordem: Ostreoida;
- Família: Ostreidae (Rafinesque, 1815);
- Gênero: *Crassostrea* (Sacco, 1897);
- Espécie: *Crassostrea gigas* (Thunberg 1897);

No Brasil existem duas espécies de ostras nativas com interesse para o cultivo do gênero *Crassostrea* (*gasar e rizophorae*) e uma exótica, a ostras do Pacífico (*gigas*). De acordo com GOSLING (2003), o ciclo de vida em moluscos bivalves é extremamente simples, envolvendo estágios de formação e maturação de gametas, com fertilização externa, desenvolvimento embrionário e larval ocorrendo na coluna d’água e o assentamento das larvas formando as sementes.

De acordo com Gosling (2003) as ostras do gênero *Crassostrea* são organismos hermafroditas assíncronos (sequencial). Não apresentam dimorfismo sexual, o que tornam necessárias análises microscópicas e/ou histológicas para identificação dos organismos quanto à sua sexualidade (GALTISOFF, 1964; GOSLING, 2003).

O controle da reprodução em moluscos bivalves ocorre por uma interação complexa de fatores endógenos e exógenos. Os fatores endógenos estão ligados à genética dos organismos e aos ciclos neuro-endócrinos. Os fatores exógenos estão interligados a fatores ambientais como disponibilidade de alimento, temperatura, salinidade, entre outros (GOSLING, 2003; MACKIE, 1984). Dentre esses fatores, a temperatura apresenta-se como um dos mais importantes para regulação dos processos reprodutivos em moluscos bivalves.

Os ciclos reprodutivos, em ambiente natural para espécies do gênero *Crassostrea*, têm sido descritos principalmente para *Crassostrea gigas*, isso devido ao fato dessa espécie de ostras ser a mais produzida no mundo e, ainda, por ser a terceira espécie de molusco bivalve mais cultivada (FAO, 2012).

Os métodos de avaliação do ciclo reprodutivo em moluscos bivalves baseiam-se em aspectos qualitativos e quantitativos. Dentre os métodos qualitativos, o mais utilizado baseia-se em análises histológicas, sendo classificadas pelas células do tecido gonádico em diferentes estágios de desenvolvimento (GOSLING, 2003). Porém, este método tende a ser subjetivo, necessitando ser acompanhado por métodos quantitativos como o índice de condição (IC). A partir do cálculo do IC é possível avaliar indiretamente os estágios reprodutivos dos animais, sendo que os IC aumentam durante o período de armazenamento de energia e gametogênese e diminui com os eventos de desova (GOSLING, 2003).

### I. 2.3 Características das áreas de estudo

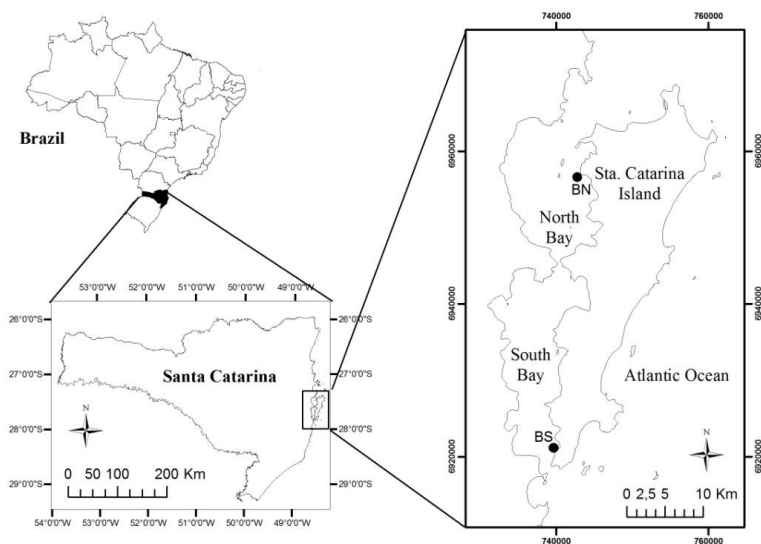
De acordo com Ferreira et al. (2004), a Baía Sul (BS) da Ilha de Santa Catarina apresenta uma profundidade média de 3,4m, com um solo predominantemente arenoso, uma energia hidrodinâmica elevada quando comparada à Baía Norte (BN) (Figura 1). O local de cultivo na BS encontra-se próximo à conexão da baía com o oceano aberto provocando um forte fluxo e renovação de água em função das marés (RUPP, 2007).

A Baía Norte apresenta baixa profundidade, raramente superior a 5 m, solo areno-lodoso, baixa hidrodinâmica devido a um maior distanciamento entre o continente e a ilha do que encontrado na BS e, ainda, uma característica de alta quantidade de material total particulado (MIZUTA et al., 2012).

Conforme EPAGRI (2015), as Baías Norte e Sul da ilha de Santa Catarina foram responsáveis por 94,37% de toda ostra (*C. gigas*)

produzida no Estado, sendo a BS responsável por 61,48% de toda produção estadual.

Figura 1. Localização dos pontos de avaliação do desempenho zootécnico de ostras diploides e triploides. BN=Baía Norte e BS=Baía Sul.



Fonte: Ciram - Centro de Informações de Recursos Ambientais e de Hidrometeorologia de Santa Catarina (2016)

## **I. 3 OBJETIVOS**

### **I. 3.1 Objetivo Geral**

Buscar a obtenção de ostras (*Crassostrea gigas*) tetraploides para viabilizar a produção comercial de ostras triploides no LMM-UFSC e avaliar o desempenho zootécnico de ostras triploides em diferentes locais de cultivo, visando contribuir para a cadeia produtiva da ostreicultura no estado de Santa Catarina, com a inserção de um novo produto no mercado.

### **I. 3.2 Objetivos Específicos**

Avaliar a tecnologia de indução à tetraploidia em ostras do Pacífico (*Crassostrea gigas*), utilizando cruzamento entre fêmeas e machos diploides, com choques de indução térmica ou 6-dimetilamino-purina, como forma alternativa ao uso da citocalasina-B em ostras.

Avaliar o desempenho zootécnico (crescimento e sobrevivência) e aspectos reprodutivos (histologia e índice de condição) de ostras triploides, expostas às condições de cultivo, em dois locais, nas Baías Norte e Sul da Ilha de Santa Catarina.



## **ARTIGO I. INDUÇÃO À TETRAPLOIDIA EM OSTRAS DO PACÍFICO, *Crassostrea gigas* (THUNBERG 1793)**

O artigo será enviado para publicação no periódico *Aquaculture*, tendo sido redigido segundo normas da referida revista científica

Indução à tertaploidia em ostras do Pacífico (*Crassostrea gigas*)

Emílio Mateus Costa MELO, Simone SÜHNEL, Francisco Carlos da SILVA, Claudio Manoel Rodrigues de MELO.

*Federal University of Santa Catarina (UFSC), Laboratory of Marine Molluscs. Rua dos Coroas, 503 – Barra da Lagoa – CEP: 88061-600 – Florianópolis – SC – Brazil. e-mail: efwp@yahoo.com.br (corresponding author)*

## Resumo

Como métodos alternativos ao uso da citocalasina-B (CB), a indução à tetraploidia em ostras do Pacífico diploides (*Crassostrea gigas*) foi testada utilizando choques com 6-dimetilamino-purina (6-DMAP) e térmicos (25 e 36° C), como indutores. A indução foi realizada simultaneamente, para todos os indutores, com aplicação dos choques na saída do primeiro corpúsculo polar no final da meiose-I, 14 min após a fertilização, a 25° C. Como ferramenta para verificação da ploidia foi utilizada a técnica de citometria de fluxo. Em todos os tratamentos foram obtidas larvas tetraploides viáveis. Não houve diferença na eficiência de indução à tetraploidia utilizando as induções com 6-DMAP, térmica ou com CB. Quanto à quantidade de larvas “D” bem formadas e o rendimento (porcentagens médias de larvas “D” bem formadas em relação ao total de larvas obtidas), não foram verificadas diferenças estatísticas entre os métodos de indução avaliados. Desta forma, sugere-se que para a indução à tetraploidia, podem ser utilizados protocolos com 6-DMAP e choques térmicos, evitando com isso a utilização da CB, um poderoso agente nocivo, tanto aos seres humanos, quanto ao ambiente.

**Palavras-chave:** poliploidia, ostricultura, melhoramento genético.

## 1. Introdução

Poliploides podem ser definidos como organismos que possuem um ou mais conjuntos de cromossomos em relação ao que ocorre naturalmente na mesma espécie (Piferrer et al., 2009). Na aquicultura os organismos triploides são utilizados para cultivo e comercialização e os organismos tetraploides, utilizados como reprodutores para obtenção de novos organismos triploides, quando cruzados com organismos normais diploides (Guo et al., 1996).

O interesse nos organismos triploides está diretamente relacionado à sua baixa capacidade reprodutiva (Nell, 2002; Mallia et al., 2005). Existem inúmeras vantagens que acompanham essa característica, dentre elas estão a maior taxa de crescimento (Normand et al., 2009), aumento da sobrevivência (Nell & Perkins, 2005) e ainda a contenção genética em caso de fuga ao ambiente natural (Guo et al., 2002; Piferrer et al., 2009). Porém, para moluscos bivalves, a triploidia não produz necessariamente uma esterilidade completa e sim uma grande redução nos processos de gametogênese (Piferrer et al., 2009).



Outro efeito positivo da triploidia diz respeito à qualidade do produto. O sabor da ostra está relacionado à sua concentração de glicogênio no tecido mole, sendo que de modo geral, ostras magras (pós-desova) ou muito maduras não possuem um sabor apreciado, o ideal são ostras com uma concentração de glicogênio de médio a alto (Nell, 2002). Portanto, com a triploidia reduzindo os processos de maturação, a qualidade do produto é preservada ao longo de todo ano (Allen & Downing, 1990 e 1991).

A produção dos organismos tetraploides possui grande interesse para laboratórios de reprodução de moluscos bivalves que trabalham com poliploides, pois estes organismos são utilizados para a produção de organismos triploides, com um simples cruzamento com organismos normais diploides, sendo conhecidos neste caso como triploides naturais (Peachey & Allen, 2016). Nesse caso, a reprodução ocorre sem a necessidade de aplicação de choques de indução, o que facilita muito a obtenção desses organismos (Guo et al., 1996).

A primeira produção de ostras (*C. gigas*) tetraploides ocorreu em 1993 nos Estados Unidos da América, utilizando o cruzamento entre fêmeas triploides com capacidade reprodutiva e machos diploides, seguido do bloqueio do primeiro corpúsculo polar, com a utilização da Citocalasina-B (CB) ( $C_{26}H_{33}O_5$ ) (Guo & Allen, 1994). Um dos aspectos negativos dessa técnica é a obrigatoriedade de formação de um plantel de reprodutores de ostras triploides, para atender a necessidade por oócitos viáveis. Outro aspecto negativo seria o choque de indução com a utilização de CB, um conhecido agente nocivo, tanto ao ser humano, quanto ao meio ambiente (Guo & Allen, 1995; Eudeline et al., 2000). A tetraploidia também pode ser obtida a partir da indução em oócitos de animais diploides, inibindo a meiose I e/ou II, ou a mitose (Beaumont & Fairbrother, 1991). Os índices de tetraploidia alcançados com essa técnica geralmente são baixos, porém não há necessidade de formação de reprodutores triploides.

Outra técnica alternativa para produção de organismos tetraploides, que apresenta uma maior eficiência em *C. gigas*, utiliza o cruzamento entre fêmeas diploides com machos tetraploides (McCombie et al., 2005), também aplicando o choque de indução com CB, durante a saída do segundo corpúsculo polar, porém devido a falta deste organismos no Brasil torna a técnica inviável.

Guo et al. (1996) confirmaram a viabilidade reprodutiva de *C. gigas* tetraplóides na produção de triploides. Nessa pesquisa foi demonstrado que ambos os sexos são capazes de produzir 100% de organismos triploides, quando cruzados com indivíduos diploides

normais. O cruzamento entre indivíduos tetraplóides produzirá novos reprodutores tetraplóides, garantindo com isso a renovação constante do estoque de reprodutores (Allen & Guo, 1994).

Neste estudo foi avaliada a tecnologia de indução à tetraploidia em ostras do Pacífico (*C. gigas*), utilizando um cruzamento entre reprodutores diploides e choques de indução aplicados no momento da saída do primeiro corpúsculo polar, com a utilização de 6-dimetilaminopurina e térmico, como forma alternativa ao uso da Citocalasina-B.

## **2. Materiais e Métodos**

### **2.1 Obtenção dos Animais**

Neste estudo foram utilizadas fêmeas diploides (com 3 anos de idade) e machos diploides (com 1 ano de idade) ambos reprodutores do Laboratório de Moluscos Marinhos da Universidade Federal de Santa Catarina (LMM-UFSC) (27°35'04"S; 48°26'29"W) e mantidos na área de cultivo experimental do LMM, praia do Sambaqui, Florianópolis, Santa Catarina, Brasil (27°29'23"S; 48°32'15"W).

### **2.2 Obtenção de gametas e fertilização**

A obtenção dos gametas ocorreu com a abertura dos reprodutores, identificação do sexo e, em seguida, a seleção dos melhores reprodutores (fêmeas: com maior quantidade de oócitos; machos: espermatozoides com maior motilidade).

Duas fêmeas foram selecionadas, lavadas com água do mar a 25° C e o excesso de água foi retirado com auxílio de papel toalha (desova a seco). Em seguida, simultaneamente, os gametas femininos foram retirados de todas as fêmeas com auxílio de uma lâmina e armazenados em recipientes secos. Logo após esse procedimento os gametas foram hidratados simultaneamente, em água do mar a 25° C, sendo posteriormente separados das impurezas utilizando peneira de 70 µm e os gametas concentrados em peneira de 18 µm. Após a retirada das impurezas, os oócitos foram hidratados por uma hora em um recipiente (20L) com um volume ajustado a 14L de água do mar (25° C e salinidade de 35gL<sup>-1</sup>). Durante este processo, a quantificação de oócitos (15 milhões) foi realizada com o auxílio de câmaras de Sedgwick-Rafter.

Para a fertilização dos oócitos femininos, um "pool" de espermatozoides (3 animais) de machos selecionados, foi obtido através

da raspagem do tecido reprodutivo em água do mar (25° C e salinidade de 35gL<sup>-1</sup>). A solução de espermatozoides foi adicionada à solução de gametas femininos com uma proporção de cerca de sete espermatozoides por oócito (7M: 1F), sendo a fertilização realizada em uma dose única e, em seguida, homogeneizada durante 5 min.

Após esse período, foram preparadas duas lâminas contendo 1 mL de solução de gametas fertilizados para a avaliação do desenvolvimento embrionário, sob microscópio de luz, para que o momento da aplicação dos choques de indução fossem determinados.

### 2.3 Indução à Tetraploidia

Quando cerca de 50% dos oócitos fertilizados, presentes nas lâminas, apresentaram o primeiro corpúsculo polar ao final da meiose I, os tratamentos de indução à tetraploidia foram iniciados simultaneamente.

A indução à tetraploidia foi realizada utilizando três métodos, sendo dois químicos: CB (Citocalasina-B; 1,0 mg L<sup>-1</sup>), 6-DMAP (6-Dimetilamino-purina; 450µmol L<sup>-1</sup>) e um físico: choque térmico (variando a temperatura de 25°C para 36°C). O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, com três repetições. Para cada repetição foram utilizados 1 milhão de oócitos fertilizados. Os choques de indução ocorreram 14 min após a fertilização [metodologia descrita por Melo et al. (2015) para triploidia].

Para o tratamento com CB, foi preparada uma solução de 1,0 mg de CB em 1 mL de dimetil-sulfóxido (DMSO - C<sub>2</sub>H<sub>6</sub>SO) e armazenadas em temperatura de -20 ° C (Allen et al., 1989). Para os choques de indução, os oócitos fertilizados foram colocados em cilindros com a tela (18 µm) e imersos em 1 L da solução de CB, durante 15 min. Após este período, o material retido na tela (embriões, gametas não fertilizados e esperma, entre outros) foi suspenso e imerso numa solução de 0,05% de DMSO em água do mar, por mais 15 min. No tratamento com 6-DMAP, foi preparada uma solução na concentração de 450 µmol e armazenada em temperatura de -20 ° C (metodologia descrita por Desrosiers et al. 1993 para triploidia). Para o choque de indução os oócitos fertilizados foram transferidos para um cilindro com tela (18 µm), sendo este submerso em 1 L de solução 6-DMAP, durante 15 min. No tratamento com choque térmico, a indução foi realizada com a transferência dos oócitos fertilizados de um recipiente (1 L) a 25 ° C para outro recipiente (1 L) a 36 ° C, onde permaneceram durante 15 min [metodologia descrita por Quillet & Panelay (1986) para triploidia]. Após este período, os

oócitos foram transferidos a partir do recipiente com a temperatura a 36°C para outro a 25°C.

Após a indução à tetraploidia, os embriões de cada tratamento foram transferidos para tanques de larvicultura (2500L), onde permaneceram durante 48 h. Todos os resíduos gerados durante os processos de indução foram separados em recipientes adequados para descarte de produtos químicos.

## 2.4 Avaliação da Ploidia

A avaliação da eficiência (%) de cada tratamento de indução a tetraploidia foi realizada 48 h após a fertilização, utilizando a técnica de citometria de fluxo. Para tanto, foram amostradas, aproximadamente, 2000 larvas de cada repetição. As larvas foram concentradas em placas de petri sendo adicionada 0,5 mL de uma solução extratora de núcleos (HCl+NaOH), durante 5 min. Após esse procedimento, as larvas foram peneiradas com malha de 35 µm e ao líquido obtido foi adicionado 1,5 mL de uma solução corante específico DAPI (4,6-diamidino-2-phenylindole), sendo então a amostra levada ao citômetro para análise. Um grupo de embriões diploides, que não sofreram nenhum processo de indução, foi mantido separado dos tratamentos para as comparações de ploidias.

## 2.5 Análise Estatística

Para cada tratamento foi avaliada a eficiência de indução (%), a quantidade de larvas “D” bem formadas e o rendimento (relação entre as larvas “D” bem formadas e o número total de larvas, após 48h da fertilização). A avaliação das larvas “D” bem formadas foi realizada sob microscópio de luz com base na descrição de Galtsoff (1964). Os dados de eficiência de indução, quantidade de larvas “D” bem formadas e o rendimento foram submetidos ao teste de Kruskal-Wallis utilizando o pacote computacional SAS® (2003).

## 3. Resultados

A eficiência de indução à tetraploidia do tratamento com indução com 6-DMAP, variou de 17.18% a 55.73%, com o choque térmico de 22.37% a 40.28% e com (CB) de 0% a 22.06%. A porcentagem média de larvas tetraploides obtidas com os tratamentos de indução com 6-DMAP

( $32.78 \pm 20.30\%$ ), choque térmico ( $29.17 \pm 9.70\%$ ) e CB ( $10.28 \pm 11.11\%$ ) não apresentaram diferença estatística ( $p < 0.05$ ).

Os picos de absorção de fluorescência, nas análises de citometria de fluxo, para os tratamentos de indução com 6-DMAP, choque térmico e CB foram respectivamente, 101.33, 104.00 e 94.67 (Figura 1). Os organismos diploides, que não sofreram nenhum processo de indução, apresentaram absorção de fluorescência de 49.12. O tratamento 6-DMAP, choque térmico e a CB apresentaram, respectivamente, 2.06, 2.11 e 1.93 vezes maior a absorção de fluorescência obtida com os organismos diploides citados anteriormente.

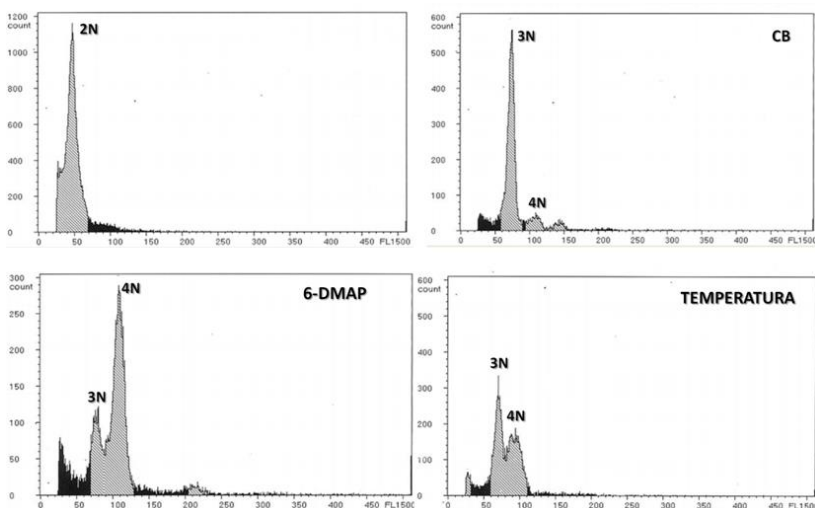


Figura 1. Análise de citometria de fluxo para larvas com 48h de idade, resultante do bloqueio do primeiro corpúsculo polar, 14 min. após a fertilização. O eixo X corresponde à fluorescência da célula núcleo (conteúdo de DNA) e o eixo Y representa o número de células contadas. 2N = diploide; 3N = triploide e 4N = tetraploide.

Os resultados obtidos para o número de larvas “D” bem formadas não apresentaram diferenças estatísticas entre os tratamentos de indução à tetraploidia com 6-DMAP ( $27.01 \pm 11.07$  larvas  $\text{mL}^{-1}$ ), choque térmico ( $32.17 \pm 15.87$  larvas  $\text{mL}^{-1}$ ) e CB ( $13.14 \pm 11.46$  larvas  $\text{mL}^{-1}$ ). O mesmo resultado foi obtido para o rendimento, onde as médias de larvas “D” bem formadas com o total de larvas obtidas nos tratamentos 6-DMAP ( $88.27 \pm 4.29\%$ ), choque térmico ( $67.70 \pm 13.47\%$ ) e CB ( $61.34 \pm 33.08\%$ ) após

48 h da fertilização, não apresentaram diferença significativa ( $p < 0,05$ ) entre eles.

#### 4. Discussão

Os resultados de indução à tetraploidia demonstraram grande potencial para a produção de um plantel de ostras tetraploides, sendo obtidas larvas “D” em todos os tratamentos de indução testados.

As fluorescências de indução à tetraploidia obtidas pela técnica de citometria de fluxo para o grupo diploide que não sofreram induções e os tratamentos ficaram dentro do esperado de acordo com Gosling & Nolan (1989). A célula núcleo de um organismo tetraploide teria que emitir duas vezes a fluorescência da célula núcleo de um organismo diploide. Como os organismos diploides emitiram uma absorção de fluorescência em média de 49.12, era de se esperar que as células núcleos tetraploides fossem encontradas por volta de 100 na absorção de fluorescência.

As eficiências de indução dos tratamentos 6-DMAP, choque térmico e CB estão dentro do esperado quando comparados com os resultados de outros estudos (Peachey & Allen, 2016; McCombie et al., 2009; Yang & Guo, 2006a,b).

Os resultados do presente estudo corroboram com os observados por Peachey & Allen (2016), os quais, trabalhando com *Crassostrea virginica*, obtiveram resultados superiores na indução à tetraploidia com a utilização de 6-DMAP, como forma alternativa ao uso da Citocalasina-B, sendo a ploidia confirmada 48 h após a fertilização. O trabalho de Peachey & Allen (2016), foi o primeiro no mundo a utilizar a 6-DMAP como forma alternativa de indução à tetraploidia para a espécie estudada (*C. virginica*).

McCombie et al. (2009) induziram à tetraploidia *Mytilus edulis* diploides, aplicando choque com CB, 5 min após a fertilização e obtiveram resultados semelhantes ao presente estudo, com sucesso de induções variando de 18-60%. Estes autores verificaram que os melhores resultados foram encontrados a partir da utilização de fêmeas individuais cruzadas com um “pool” de espermatozoides de dois machos.

No tratamento de indução à tetraploidia por choque térmico (25-36°C), os resultados do presente estudo se mostraram ainda mais interessantes, tendo em vista que para tal procedimento não se torna necessária a aquisição de nenhum produto químico e nem mesmo a necessidade de cuidados especiais durante os processos de indução.

Resultados semelhantes aos do presente estudo foram descritos nos trabalhos realizados por Yang & Guo (2006a,b). No primeiro trabalho, Yang & Guo, (2006a), verificaram o sucesso de indução à tetraploidia em moluscos de areia *Mulinia lateralis* com a utilização de choques térmicos 10min. após a fertilização, iniciando em 23-24°C para as temperaturas de 32°, 35° e 38°C, com o choque térmico ocorrendo na mitose-I e obtiveram os melhores resultados para a temperatura de 35° C, alcançando 82,8% das larvas tetraploides. No segundo trabalho, Yang & Guo (2006b), aplicando choque térmico em embriões diploides, a partir de 23°C para as temperaturas de 32°, 35° e 38°C, obtiveram resultados 77.3% e 67.2% de sucesso na indução à tetraploidia em larvas de *Mercenaria mercenaria* com as temperaturas de 35° e 38° C, respectivamente.

Em relação ao total de larvas “D” bem formadas/mL e o rendimento após 48 h da fertilização, foi superior ao esperado (<50%), tendo em vista que os processos de indução geralmente provocam grande mortalidade devido aos efeitos deletérios que os choques de indução promovem (Guo & Allen, 1994). Porém outros estudos precisam ser elaborados para determinação da sobrevivência ao longo do período de larvicultura.

O presente estudo obteve as primeiras larvas de ostras *Crassostrea gigas* tetraploides já produzidas no Brasil, demonstrando grande importância para o futuro da cadeia produtiva, podendo alterar toda a dinâmica de produção e comercialização de sementes de ostras no país. Além disso, com a produção de animais tetraploides, torna-se desnecessária a utilização de processos indiretos de induções químicas ou térmicas para obtenção de organismos triploides, sendo estes obtidos com o cruzamento entre organismos tetraploides e diploides (Guo & Allen, 1996; Eudeline et al., 2000), possibilitando a produção massiva de organismos triploides. Além disso, vale ressaltar que a utilização da CB é proibida em diversos países (Food and Drug Administration–USA, União Européia), devido ao seu elevado poder nocivo, tanto ao operador, quanto ao meio ambiente (Guo & Allen, 1995; Eudeline et al., 2000; Nell, 2002; Piferrer et al., 2009) e por isso, deve ser evitado o seu uso em posteriores processos de indução.

Como os organismos tetraploides serão utilizados apenas como reprodutores, os resultados são bastante promissores, podendo ser direcionados para a formação de um plantel de reprodutores ou de posteriores estudos com criopreservação do sêmen desses organismos. Os métodos avaliados foram eficientes para os processos futuros de indução à tetraploidia em ostras (*C. gigas*), podendo ser utilizados como método

de indução indireta, tanto a 6-DMAP, quanto o choque térmico, em substituição à CB.

Os resultados deste estudo colocam o Brasil num restrito grupo de países no Mundo, como USA (Eudeline et al., 2000) e França (McCombie, et al., 2005) que obtiveram sucesso na indução a tetraploidia em ostras do Pacífico (*Crassostrea gigas*), podendo com isso, aumentar significativamente a utilização de poliploides na cadeia produtiva. Entretanto, deve-se realizar um estudo para avaliar a produção e o cultivo de ostras tetraploides até sua maturidade sexual. Isso trará uma ótima oportunidade para estudos relacionados aos aspectos reprodutivos deste tipo de organismos no Brasil e ainda na verificação do potencial reprodutivo destes reprodutores na produção de organismos triploides.

## 5. Referências

- Allen, J.S.K., Downing, S.L., Chew, K.K. 1989. Hatchery Manual for Producing Triploid Oysters. University of Washington Press, Seattle, WA. 27 pp.
- Allen, J.S.K., Downing, S.L. 1990. Performance of triploid Pacific oysters, *Crassostrea gigas*: gametogenesis. Can. J. Fish Aquat. Sci. 47, 1213–1222.
- Allen, J.S.K., Downing, S.L. 1991. Consumers and experts alike prefer the taste of sterile triploid over gravid diploid Pacific oysters (*Crassostrea gigas*, Thunberg). J. Shellfish Res. 10:19-22.
- Beaumont, A.R., Fairbrother, J.E. 1991. Ploidy manipulation in molluscan shellfish: a review. J. Shellfish Res. 10: 1–18.
- Desrosiers, R.R., Gérard, A., Peignon, J.M., Naciri, Y., Dufresne, L., Morasse, J., Ledu, C., Phelipot, P., Guerrier, P., Dubé, F. 1993. A novel method to produce triploids in bivalve molluscs by the use of 6-dimethylaminopurine. J. Exp. Mar. Biol. Ecol. 170: 29-43.
- Eudeline, B., Allen, J.S.K., Guo, X. 2000. Optimization of tetraploid induction in Pacific oysters, *Crassostrea gigas*, using first polar body as a natural indicator. Aquaculture 187: 73–84.
- Galtsoff, P.S. 1964. The American oyster *Crassostrea virginica* Gmelin. United States Government Printing Office, Washington, D.C. Fishery Bulletin 64: 480pp.



- Gosling, E.M., Nolan, A. 1989. Triploidy induction by thermal shock in the Manila Clam, *Tapes semidecussatus*. *Aquaculture* 78: 223-228.
- Guo, X., Allen, J.S.K. 1994. Viable tetraploids in the Pacific oyster (*Crassostrea gigas* Thunberg) produced by inhibiting polar body I in eggs from triploids. *Mol. Mar. Biol. Biot.* 3: 42-50.
- Guo, X., Allen, J.S.K. 1995. The successful induction of tetraploidy in the Pacific oyster *Crassostrea gigas* (Thunberg). *Aquaculture* 137: 149-160.
- Guo, X., DeBrosse, G.A., Allen, J.S.K. 1996. All-triploid Pacific oysters (*Crassostrea gigas* Thunberg) produced by mating tetraploids and diploids. *Aquaculture* 142: 149-161.
- Guo, X., Wang, J., Landau, B.J., Li, L., DeBrosse, G.A.; Krista, K.D. 2002. The successful production of tetraploid eastern oyster, *Crassostrea virginica* (Gmelin). *J. Shellfish Res.* 21: 280-281.
- Mallia, J.V., Muthiah, P., Thomas, C.P. 2005. Growth of triploid oyster, *Crassostrea madrasensis* (Preston). *Aquaculture Res.* 37: 718-724.
- McCombie, H., Ledu, C., Philepot, P., Lapègue, S., Boudry, P., Gérard, A. 2005. A Complementary method for production of tetraploid *Crassostrea gigas* using crosses between diploids and tetraploids with cytochalasin-B treatments. *Mar. Biot.* 7: 318-330.
- McCombie, H., Cornette, F., Beaumont, A. R. 2009. Short sharp shock produces viable tetraploids in crosses of diploid blue mussel *Mytilus edulis*. *Aquaculture Res.* 1-3.
- Melo, E.M.C., Gomes, C.H.A.M., Silva, F.C., Sühnel, S., Melo, C.M.R. 2015. Chemical and physical methods of triploidy induction in *Crassostrea gigas* (Thunberg 1793). *Scient. J. Fisheries, Aquac. Lim.* 41: 889-898.
- Nell, J.A. 2002. Farming triploid oysters. *Aquaculture* 210: 69-88.
- Nell, J.A., Perkins, B. 2005. Studies on triploid oysters in Australia: farming potential of all-triploid Pacific oysters, *Crassostrea gigas*

- (Thunberg), in Port Stephens, New South Wales, Australia. *Aquaculture Res.* 6: 530-536.
- Normand, J., Ernande, B., Haure, J., McCombie, H., Boudry, P. 2009. Reproductive effort and growth in *Crassostrea gigas*: comparison of young diploid and triploid oysters issued from natural crosses or chemical induction. *Aquatic Biology* 7: 229-241.
- Peachey, B.L., Allen, J.S.K. 2016. Evaluation of cytochalasin B and 6-dimethylaminopurine for tetraploidy induction in the Eastern oyster, *Crassostrea virginica*. *Aquaculture* 450: 199-205.
- Piferrer, F., Beaumont, A., Falguière, J., Flajshans, M., Haffray, P., Colombo, L. 2009. Polyploid fish and shellfish: Production, biology and applications to aquaculture for performance improvement and genetic containment. *Aquaculture* 29: 125-156.
- Quillet, E., Panelay, P.J. 1986. Triploidy induction by thermal shocks in the Japanese oyster, *Crassostrea gigas*. *Aquaculture* 57: 271-279.
- SAS Institute Inc. 2003. SAS OnlineDoc® 9.1. Cary, NC: SAS Institute Inc.
- Yang, H., Guo, X. 2006a. Polyploid induction by heat shock-induced meiosis and mitosis inhibition in the dwarf surfclam, *Mulinia lateralis* Say. *Aquaculture* 252: 171-182.
- Yang, H., Guo, X. 2006b. Tetraploid induction by inhibiting mitosis I with heat shock, cold shock, and nocadazole in the hard clam *Mercenaria mercenaria* (Linnaeus, 1758). *Mar. Biot.* 8: 501-510.

## **ARTIGO II. DESEMPENHO ZOOTÉCNICO DE OSTRAS DO PACÍFICO (*Crassostrea gigas*, THUNBERG 1793) TRIPLOIDES EM SANTA CATARINA**

O artigo será enviado para publicação no periódico Ciencias Marinas, sendo redigido segundo as normas da referida revista científica

Desempenho zootécnico de ostras do Pacífico (*Crassostrea gigas*) triploides em Santa Catarina

Emílio Mateus Costa MELO, Simone SÜHNEL, Claudio Manoel Rodrigues de MELO

*Federal University of Santa Catarina (UFSC), Laboratory of Marine Molluscs. Rua dos Coroaes, 503 – Barra da Lagoa – CEP: 88061-600 – Florianópolis – SC – Brazil. e-mail: efwp@yahoo.com.br (corresponding author)*

## RESUMO

Três experimentos de cultivo de ostras *Crassostrea gigas* diploides (2N) e triploides (3N), entre os anos de 2013 e 2016, foram realizados para avaliar o desempenho zootécnico (peso fresco total, altura e sobrevivência) em dois locais de cultivo: Baías Norte (BN) e Sul (BS) da Ilha de Santa Catarina, Brasil. Os experimentos foram independentes e inteiramente ao acaso, comparando-se o desempenho de animais 2N x 3N em dois locais de cultivo. No momento das despescas os resultados finais para peso fresco total e altura entre os tratamentos, apresentaram um padrão semelhante para os experimentos I e III, sendo as ostras 3N superiores às ostras 2N. Na biometria 2 do experimento II (verão), as ostras 3N também foram superiores estatisticamente às ostras 2N. Quanto à sobrevivência da despesca, as ostras 3N foram superiores ( $p < 0,05$ ) às ostras 2N apenas no experimento I, não havendo diferença ao final do estudo no experimento II e as ostras 2N sendo superiores às ostras 3N no experimento III. Os resultados deste estudo apresentam grande importância para a cadeia produtiva de ostras no estado de Santa Catarina, podendo alterar toda dinâmica anual de produção e comercialização desse produto.

**Palavras-chave:** poliploides, ostreicultura, ostras, crescimento, sobrevivência

## 1. INTRODUÇÃO

De acordo com a FAO (2012), a produção mundial de aquicultura em 2010 foi de aproximadamente 60 milhões de toneladas, sendo representada por peixes, crustáceos, moluscos e plantas aquáticas. Quando relacionamos só a aquicultura marinha, o total produzido em 2010 foi de 18,3 milhões de toneladas, onde o cultivo de moluscos bivalves representou 75,5% (13,9 milhões de toneladas) desse total. Dentre as espécies de moluscos bivalves mais cultivadas no mundo estão *Ruditapes philippinarum* (Manila clam), *Crassostrea gigas* (ostras do Pacífico) e na China as espécies de vieiras *Argopecten irradians* e *Patinopecten yessoensis*.

A ostra do Pacífico (*Crassostrea gigas*) é a espécie de ostra mais produzida e o terceiro molusco bivalve em volume de produção mundial, com um total produzido de aproximadamente 626 mil toneladas em 2014 (FAO 2014). No Brasil, o cultivo de ostras baseia-se quase em sua

totalidade na produção dessa espécie, representando mais de 90% da produção nacional no ano de 2012 (Brasil, 2014).

Em 2014, a produção total de moluscos em Santa Catarina cresceu 12,95%, sendo que na atividade da ostreicultura a produção teve um aumento de 25,17%, ambos em relação ao ano anterior. Nos locais escolhidos (BN e BS) para os testes de campo encontram-se os maiores produtores de ostras do Brasil, contando com 81,4% de todos os maricultores do estado de Santa Catarina, sendo estes responsáveis por 94,37% da produção de ostras deste Estado (Epagri, 2015).

A mortalidade de verão é conhecida e relatada desde a década de 1940 no Japão e vem sendo identificada em vários países como a França (Goulletquer et al. 1998; Gagnaire et al. 2006), Estado Unidos (Cheney et al. 2000) e Irlanda (Samain e McCombie 2008). Dentre os fatores que atuam na intensificação dessa síndrome, pode-se citar a maturação gonádica, as práticas de manejo, aumento da temperatura, presença de agentes patogênicos ou poluentes (Goulletquer et al. 1998). Como esses eventos de mortalidades ocorrem principalmente durante o período de verão, período reprodutivo das ostras (*Crassostrea*), alguns autores acreditam que tais mortalidades estejam interligadas a esse período (Gagnaire et al. 2006, Goulletquer et al. 1998).

Com tantos fatores afetando a sobrevivência e a qualidade desses organismos, tornou-se necessário a utilização de ferramentas genéticas que proporcionem melhorias zootécnicas aos organismos cultivados, ou uma sensível diminuição de seu esforço reprodutivo (Nell 2002; Mallia et al. 2005). As principais características zootécnicas de interesse para o cultivo de moluscos bivalves são o ganho em crescimento (peso e altura) (Normand et al. 2009), melhorias nas taxas de sobrevivência (Nell e Perkins 2005) e melhoria do sabor (Allen e Downing, 1990 e 1991).

Dentre as ferramentas genéticas aplicadas em moluscos bivalves encontra-se a manipulação cromossômica para obtenção de organismos triploides e tetraploides, já amplamente estudada e utilizada em vários países no mundo, tais como Estados Unidos (EUA) com a espécie *Crassostrea virginica* (Stone et al. 2013; Dégremont et al. 2012; Walton et al. 2013); França com *Crassostrea gigas* (Gagnaire et al. 2006); Austrália com *Saccostrea commercialis* (Nell et al. 1994) e no México com *Argopecten ventricosus* (Verdugo et al. 2000). No Brasil, os estudos com ostras triploides da espécie *Crassostrea gigas* triploides iniciaram com Melo et al. (2015), os quais avaliaram diferentes métodos de indução à poliploidia.

A triploidia pode ser utilizada como uma ferramenta para diminuir o esforço reprodutivo das ostras possuindo também o potencial para

produzir animais com melhor desempenho em campo (Allen e Downing 1986; Hawkings et al. 1994; Hand et al. 1998; Nell 2002). Sendo parcialmente estéreis, as ostras triploides podem transferir menos energia bioquímica para a reprodução e, assim, o organismo teria mais energia para crescimento e outras funções metabólicas (Nell et al. 1994).

De maneira geral, a triploidia pode ser obtida de duas formas em moluscos bivalves: a indireta, utilizando indutores químicos ou físicos para retenção de um dos corpúsculos polares em oócitos fertilizados de reprodutores diploides (Allen e Downing 1986) e a direta, com a utilização de reprodutores tetraploides cruzados com organismos normais diploides (Guo et al. 1996). A primeira, geralmente produz uma eficiência inferior a 100% (Eudeline et al. 2000; Nell, 2002; Piferrer et al. 2009) e a segunda produz 100% de organismos triploides (Guo et al. 1996).

A avaliação dos possíveis ganhos zootécnicos em ostras triploides nunca foram documentadas no Brasil, fato que possibilita uma oportunidade única no campo da pesquisa. Aspectos zootécnicos, como crescimento em peso fresco total e altura e sobrevivência precisam ser analisados e comparados com outros locais de cultivo para uma melhor avaliação do potencial da ostra triploide. Para tanto, o objetivo deste estudo foi avaliar desempenho zootécnico em crescimento (peso fresco total e altura) e a sobrevivência de ostras *C. gigas* triploides, cultivadas em dois locais na Ilha de Santa Catarina.

## 2. MATERIAIS E MÉTODOS

### 2.1 Localização

Três experimentos independentes de cultivo de ostras da espécie *Crassostrea gigas* foram realizados em dois ambientes de cultivo, na Ilha de Santa Catarina (Figura 1), na Baía Norte (BN), área de cultivo experimental do Laboratório de Moluscos Marinhos da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC), Sambaqui (27°28'30"S; 48°33'40"W) e, na Baía Sul (BS), área de cultivo comercial da Fazenda Marinha Paraíso das Ostras, Caieira da Barra do Sul (27°49'0"S; 48°33'50"W) (Figura 1).

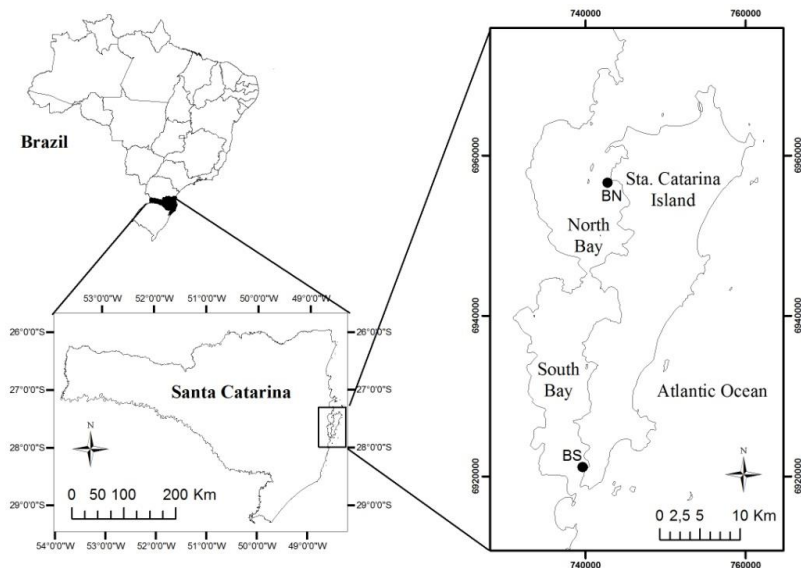


Figura 1. Localização dos pontos de instalação das unidades experimentais para os três experimentos de avaliação do desempenho zootécnico de ostras diploides e triploides. BN=Baía Norte e BS=Baía Sul.

## 2.2 Obtenção de sementes de ostras diploides e triploides

As ostras diploides (2N) da espécie *Crassostrea gigas*, utilizadas neste estudo, foram produzidas pelo Laboratório de Moluscos Marinhos (LMM/UFSC) (27°35'0"S; 48°26'28"W), de acordo com metodologia descrita por Melo et al. (2015).

As ostras triploides (3N), utilizadas no experimento I, foram produzidas pelo Laboratório Blue Water Aquaculture (BWA) (27°42'58"S; 48°30'13"W), de maneira direta, com o cruzamento de machos tetraploides com fêmeas diploides. Já as ostras triploides (3N-DMAP), utilizadas no experimento II e III, foram produzidas no LMM/UFSC de forma indireta (Guo e Allen 1994), com indução química por 6-dimetilamino-purina (6-DMAP), utilizando reprodutores 2N.

Para o experimento I foram utilizadas sementes de ostras 2N e 3N com altura média de 4mm e com idade aproximada de 101 dias. Já para o experimento II e III utilizou-se sementes de ostras 2N e 3N com uma altura média de 8mm, com idade aproximada de 115 e 90 dias, respectivamente, sendo que em cada experimento as ostras 2N e 3N apresentavam idade e tamanho semelhantes.

## 2.3 Experimentos

Os experimentos I, II e III foram realizados em um delineamento inteiramente ao acaso em esquema fatorial com dois fatores (ploidia: ostras 2N x ostras 3N; e local: BN e BS). As unidades experimentais foram compostas por lanternas (berçários, intermediárias e definitivas) de 4 andares. As características de cada experimento são apresentadas a seguir na Tabela 1.

Tabela 1. Início dos experimentos, duração, repetições e número de biometrias realizadas.

Experimento	Início	Duração (meses)	Repetições	Nº Biometrias
I	05/2013	10	6	5
II	10/2013	7	5	3
III	05/2015	11	6	8

Para os experimentos, a cada biometria foram coletados os dados de altura (mm) e o peso fresco total (g) de 30 indivíduos por lanterna. Além disso, foi contado o número de animais mortos para calcular a sobrevivência. O crescimento (altura e peso fresco total) e a sobrevivência foram analisados via análise de variância bifatorial utilizando o pacote computacional SAS® (2003).

## 2.4 Manejo de cultivo

Nos três experimentos, o manejo aplicado durante o período de cultivo foi semelhante ao utilizado por produtores comerciais de ostras *C. gigas* no estado de Santa Catarina, inclusive o número de manejos ao longo do cultivo. O manejo das ostras foi composto pela limpeza das lanternas berçários quinzenalmente, das lanternas intermediárias e definitivas mensalmente (Tabela 2), com a utilização de jato de água sob pressão para remoção do lodo e as incrustações presentes nas ostras e nas estruturas de cultivo.

Previamente às biometrias, foi realizada a remoção manual, com a utilização de cutelos, dos incrustantes presentes nas ostras amostradas. A altura (mm) das ostras foi medida conforme metodologia descrita por Lopes et al. (2013), utilizando paquímetro e, o peso fresco total (g), utilizando balança digital com precisão de três casas decimais.



Tabela 2. Densidade de estocagem, tipo de lanterna e manejo das ostras para cada fase de cultivo nos três experimentos.

Item	Fases			
	Semente	Juvenil	Adulto	Despesca
Tamanho (mm)	>3	>30	>50	70-120
Densidade/andar	1000	200	80	60
Tipo de Lanterna	Berçário	Intermediária	Definitiva	Definitiva
Malha da Lanterna	2	20	40	40
Manejo (Intervalo em dias)	15	30	30	30

## 2.5 Avaliação da Ploidia

As análises das ploidias das larvas de *C. gigas* foram realizadas utilizando Citômetro de Fluxo (Partec-PA). A análise das ploidia das larvas foi realizada 48h após a fertilização, em aproximadamente 2000 larvas por tratamento, de acordo com Melo et al. (2015). Brevemente, as larvas foram colocadas em becker de 5 mL, ao qual foram adicionados 0,5 mL de solução de extração núcleo (NaOH + HCl) e 1,5 mL de um corante específico DAPI (4,6-diamidino-2-fenilindole) à solução filtrada. As ostras 2N foram utilizadas como padrão para comparação entre as ploidias em ambas as fases de vida pesquisadas.

## 3. RESULTADOS

No experimento I, 100% das sementes utilizadas eram 3N, por serem obtidas a partir da fertilização de oócitos de fêmeas diploides com machos tetraploides. No experimento II e III foram utilizados lotes 3N obtidos a partir de um processo de indução indireta, com a utilização da 6-dimetilamino-purina (6-DMAP), com uma eficiência de 84% e 81%, respectivamente.

### 3.1 Crescimento em peso fresco total das ostras

As diferenças verificadas ( $p < 0,05$ ) nos locais de cultivo para peso fresco total (g) ocorreram nas biometrias 1, 2, 3 e 4; biometria 2 e biometrias 1, 2, 6, 7 e 8, respectivamente, nos experimento I, II e III (Tabela 3; Figura Suplementar 2).

Com relação aos tratamentos, nas biometrias 1, 2 e 3 no experimento I, as ostras 2N apresentaram superioridade sobre as ostras 3N. No momento da despesca (Biometria 5) as ostras 3N foram superiores

às ostras 2N. Já no experimento II, os resultados de peso fresco total apresentaram diferenças significativas nas biometrias 1 e 2, sendo as ostras 3N superiores estatisticamente às ostras 2N. Nas biometrias 2, 5 e 8 no experimento III, as ostras 3N foram superiores às ostras 2N.

Na interação entre locais e tratamentos, no experimento I a diferença ocorreu apenas na biometria 4, sendo as ostras 2N BN superiores estatisticamente às ostras 3N BN, 2N BS e 3N BS. As ostras 3N BS e 3N BN foram superiores às ostras 2N BS. No experimento II na biometria 3, foram encontradas diferenças significativas, sendo as ostras 3N BS superiores às ostras 2N BS. No experimento III, a interação ocorreu na biometria 2, sendo as ostras 3N BN superiores estatisticamente às demais (2N BN, 2N BS e 3N BS).

Tabela 3. Médias de peso fresco total (g) de ostras *Crassostrea gigas* para os locais, Baía Norte (BN) e Baía Sul (BS) e para os tratamentos diploides (2N) e triploides (3N) nos experimentos I, II e III.

Experimento	Mês/Idade	LOCAL		TRATAMENTOS	
		BN	BS	2N	3N
I	Jun/101	3,74±0,83 <sup>a</sup>	2,64±0,84 <sup>b</sup>	3,78±0,77 <sup>a</sup>	2,60±0,78 <sup>b</sup>
	Jul/132	14,95±0,78 <sup>a</sup>	8,51±2,09 <sup>b</sup>	13,30±4,70 <sup>a</sup>	10,15±4,41 <sup>b</sup>
	Out/207	45,84±8,09 <sup>a</sup>	37,60±7,88 <sup>b</sup>	47,37±5,93 <sup>a</sup>	36,08±5,72 <sup>b</sup>
	Dez/284	90,08±12,37 <sup>a</sup>	80,55±7,69 <sup>b</sup>	86,97±16,77 <sup>a</sup>	83,66±3,30 <sup>a</sup>
	Jan/317	100,93±24,04 <sup>a</sup>	99,89±36,36 <sup>a</sup>	91,91±0,69 <sup>b</sup>	108,91±2,16 <sup>a</sup>
II	Dez/115	32,55±6,43 <sup>a</sup>	34,32±6,84 <sup>a</sup>	28,74±1,05 <sup>b</sup>	38,13±1,45 <sup>a</sup>
	Fev/175	55,18±11,08 <sup>b</sup>	68,96±9,44 <sup>a</sup>	54,81±10,56 <sup>b</sup>	69,32±8,92 <sup>a</sup>
	Abr/235	89,96±4,45 <sup>a</sup>	92,35±7,28 <sup>a</sup>	90,16±4,18 <sup>a</sup>	92,15±7,55 <sup>a</sup>
III	Jun/94	5,60±0,33 <sup>a</sup>	3,86±0,09 <sup>b</sup>	4,58±1,12 <sup>a</sup>	4,88±1,35 <sup>a</sup>
	Jul/126	10,44±1,73 <sup>a</sup>	9,59±0,03 <sup>b</sup>	9,41±0,28 <sup>b</sup>	10,62±1,48 <sup>a</sup>
	Ago/163	25,91±0,76 <sup>a</sup>	24,87±0,37 <sup>a</sup>	25,53±1,30 <sup>a</sup>	25,25±0,17 <sup>a</sup>
	Out/204	40,38±4,82 <sup>b</sup>	44,84±1,75 <sup>a</sup>	41,53±6,44 <sup>a</sup>	43,69±0,13 <sup>a</sup>
	Nov/238	54,67±4,68 <sup>a</sup>	58,14±2,98 <sup>a</sup>	53,70±3,30 <sup>b</sup>	59,12±1,61 <sup>a</sup>
	Dez/266	68,35±2,61 <sup>b</sup>	73,28±0,44 <sup>a</sup>	69,74±4,57 <sup>a</sup>	71,89±2,40 <sup>a</sup>
	Fev/326	78,96±7,71 <sup>b</sup>	94,54±3,62 <sup>a</sup>	82,75±13,06 <sup>b</sup>	90,76±8,97 <sup>a</sup>
	Mar/359	86,30±5,39 <sup>b</sup>	106,24±0,11 <sup>a</sup>	94,40±16,84 <sup>a</sup>	98,14±11,35 <sup>a</sup>

Para cada efeito (local e tratamento), médias com letras diferentes na linha diferem significativamente pelo teste de Tukey ( $p<0,05$ ).

### 3.2 Crescimento em altura das ostras

Quanto à altura (mm), as diferenças ( $p<0,05$ ) observadas para os locais de cultivo ocorreram nas biometrias 1, 2, 3 e 5; na biometria 2; e para as biometrias 1, 2, 6, 7 e 8, respectivamente, nos experimentos I, II e III. Entre os tratamentos houve diferença ( $p<0,05$ ) nas biometrias 1, 2, 3 e 5; nas biometrias 1 e 2; e nas biometrias 2 e 7, respectivamente, nos experimentos I, II e III. Na interação entre os locais e os tratamentos, houve diferença ( $p<0,05$ ) na biometria 4 e nas biometrias 2 e 7,

respectivamente, nos experimento I e III (Tabela 4; Figura Suplementar 3).

Na comparação entre os tratamentos, no experimento I nas biometrias 1, 2 e 3, a altura das ostras 2N foram superiores estatisticamente às ostras 3N. Porém, na última biometria (5), as ostras 3N foram superiores em altura às ostras 2N. No experimento II, nas biometrias 1 e 2 as ostras 3N foram superiores às ostras 2N, respectivamente. O experimento III, as diferenças foram identificadas nas biometrias 2 e 7, sendo as ostras 3N superiores às ostras 2N.

Na interação entre os locais e os tratamentos as diferenças significativas foram encontradas no experimento I na biometria 4, sendo as ostras 2N BN e 3N BS superiores as ostras 3N BN. No experimento III, a interação ocorreu na biometria 2, onde as ostras 3N BN foram superiores às ostras 2N BN e às ostras 3N BS. Na mesma biometria as ostras 2N BN foram superiores às ostras 2N BS e 3N BS. Na biometria 7, a interação mostrou superioridade significativa das ostras 3N BN em relação às demais (2N BN, 2N BS e 3N BS).

Tabela 4. Médias das alturas (mm) de ostras *Crassostrea gigas* para os locais, Baía Norte (BN) e Baía Sul (BS) e para os tratamentos diploides (2N) e triploides (3N), nos experimentos I, II e III.

Experimento	Mês/Idade	LOCAL		TRATAMENTOS	
		BN	BS	2N	3N
I	Jun/101	39,98±6,41 <sup>a</sup>	37,79±6,47 <sup>b</sup>	42,00±6,89 <sup>a</sup>	35,77±4,30 <sup>b</sup>
	Jul/132	58,29±7,54 <sup>a</sup>	49,13±6,36 <sup>b</sup>	55,86±8,47 <sup>a</sup>	51,56±7,64 <sup>b</sup>
	Out/207	76,56±10,72 <sup>a</sup>	74,14±8,71 <sup>b</sup>	78,97±9,5 <sup>a</sup>	71,73±8,73 <sup>b</sup>
	Dez/284	96,09±12,77 <sup>a</sup>	97,47±14,84 <sup>a</sup>	97,69±14,42 <sup>a</sup>	95,87±13,28 <sup>a</sup>
	Jan/317	94,50±12,89 <sup>b</sup>	99,03±13,11 <sup>a</sup>	93,65±12,63 <sup>b</sup>	99,88±13,03 <sup>a</sup>
II	Dez/115	78,74±14,62 <sup>a</sup>	79,40±10,73 <sup>a</sup>	75,55±11,31 <sup>b</sup>	82,59±12,80 <sup>a</sup>
	Fev/175	81,44±13,98 <sup>b</sup>	91,76±12,74 <sup>a</sup>	83,33±13,44 <sup>b</sup>	89,87±14,09 <sup>a</sup>
	Abr/235	92,38±13,54 <sup>b</sup>	95,30±11,34 <sup>a</sup>	92,58±12,37 <sup>a</sup>	95,10±12,06 <sup>a</sup>
III	Jun/94	45,86±7,85 <sup>a</sup>	41,07±6,68 <sup>b</sup>	43,25±7,81 <sup>a</sup>	43,67±7,52 <sup>a</sup>
	Jul/126	54,70±11,41 <sup>a</sup>	49,83±7,34 <sup>b</sup>	51,45±9,95 <sup>b</sup>	53,09±9,78 <sup>a</sup>
	Ago/163	70,68±12,54 <sup>a</sup>	69,51±9,85 <sup>a</sup>	70,86±11,15 <sup>a</sup>	69,33±11,25 <sup>a</sup>
	Out/204	79,05±14,25 <sup>a</sup>	82,17±11,91 <sup>a</sup>	79,99±13,82 <sup>a</sup>	81,23±12,53 <sup>a</sup>
	Nov/238	83,85±12,71 <sup>a</sup>	85,95±11,31 <sup>a</sup>	83,10±11,76 <sup>a</sup>	86,70±12,38 <sup>a</sup>
	Dez/266	86,74±12,51 <sup>b</sup>	92,93±12,90 <sup>a</sup>	89,21±13,63 <sup>a</sup>	90,47±12,44 <sup>a</sup>
	Fev/326	86,44±12,63 <sup>b</sup>	96,82±12,80 <sup>a</sup>	90,05±14,77 <sup>b</sup>	93,22±12,54 <sup>a</sup>
	Mar/359	86,62±11,28 <sup>b</sup>	98,14±11,67 <sup>a</sup>	91,55±12,64 <sup>a</sup>	93,21±13,01 <sup>a</sup>

Para cada efeito (local e tratamento), médias com letras diferentes na linha diferem significativamente pelo teste de Tukey ( $p<0,05$ ).

### 3.3 Sobrevivência

A avaliação da sobrevivência nos locais de cultivo apresentou diferença ( $p<0,05$ ) nas biometrias 3 e 5; nas biometrias 3, 7 e 8, respectivamente, nos experimento I e III. Na comparação entre os

tratamentos, houve diferença ( $p<0,05$ ) na biometria 5; nas biometrias 1 e 2; e nas biometrias 1, 4, 7 e 8, respectivamente, nos experimentos I, II e III. As interações entre os locais e tratamentos, apresentaram diferença ( $p<0,05$ ), na biometria 5; e na biometria 8, respectivamente, nos experimentos I e III (Tabela 5; Figura Suplementar 4).

Com relação aos tratamentos, na biometria 5 do experimento I houve superioridade ( $p<0,05$ ) das ostras 3N em relação às ostras 2N. Nas biometrias 1 e 3 do experimento-II as ostras 3N foram superiores estatisticamente às ostras 2N. Nas biometrias 1 e 8 do experimento III, as ostras 2N foram superiores às ostra 3N. Enquanto que nas biometrias 4 e 7 as ostras 3N foram superiores em sobrevivência as ostras 2N.

A interação entre local e tratamento ocorreu na biometria 5 no experimento I, sendo as ostras 3N BS superiores às ostras 2N BS. Na biometria 8 do experimento III, as ostras 2N BN foram superiores às ostras 3N BN e 2N BN e 3N BS superiores às ostras 3N BN.

Tabela 5. Médias de sobrevivência (%) de ostras *Crassostrea gigas* para os locais, Baía Norte (BN) e Baía Sul (BS) e para os tratamentos diploides (2N) e triploides (3N), nos experimentos I, II e III.

Experimento	Mês/Idade	LOCAL		TRATAMENTOS	
		BN	BS	2N	3N
I	Jun/101	80,89±6,85 <sup>a</sup>	85,80±6,98 <sup>a</sup>	81,01±7,31 <sup>a</sup>	85,67±6,60 <sup>a</sup>
	Jul/132	96,61±2,85 <sup>a</sup>	98,00±1,65 <sup>a</sup>	96,72±2,74 <sup>a</sup>	97,89±1,91 <sup>a</sup>
	Out/207	99,18±0,81 <sup>a</sup>	87,47±10,01 <sup>b</sup>	92,63±7,83 <sup>a</sup>	94,02±11,03 <sup>a</sup>
	Dez/284	96,13±5,46 <sup>a</sup>	96,55±3,44 <sup>a</sup>	96,07±4,82 <sup>a</sup>	96,61±4,28 <sup>a</sup>
	Jan/317	79,97±3,93 <sup>b</sup>	86,15±10,75 <sup>a</sup>	78,51±6,74 <sup>b</sup>	87,61±7,89 <sup>a</sup>
II	Dez/115	91,70±9,38 <sup>a</sup>	94,77±3,31 <sup>a</sup>	88,68±7,43 <sup>b</sup>	97,78±1,72 <sup>a</sup>
	Fev/175	91,03±7,53 <sup>a</sup>	90,47±7,61 <sup>a</sup>	85,66±6,91 <sup>b</sup>	95,84±3,08 <sup>a</sup>
	Abri/235	87,99±8,67 <sup>a</sup>	88,63±8,80 <sup>a</sup>	84,28±9,34 <sup>a</sup>	92,33±6,07 <sup>a</sup>
	Jun/94	89,02±12,68 <sup>a</sup>	89,46±2,46 <sup>a</sup>	94,59±4,80 <sup>a</sup>	83,89±5,42 <sup>b</sup>
III	Jul/126	97,70±1,46 <sup>a</sup>	98,04±2,11 <sup>a</sup>	98,10±2,03 <sup>a</sup>	97,64±1,51 <sup>a</sup>
	Ago/163	75,17±2,40 <sup>b</sup>	98,33±1,35 <sup>a</sup>	86,38±18,25 <sup>a</sup>	87,12±14,51 <sup>a</sup>
	Out/204	96,50±1,60 <sup>a</sup>	97,20±3,11 <sup>a</sup>	95,19±0,26 <sup>a</sup>	98,52±1,24 <sup>a</sup>
	Nov/238	99,16±0,70 <sup>a</sup>	97,91±1,29 <sup>a</sup>	98,33±1,88 <sup>a</sup>	98,74±0,11 <sup>a</sup>
	Dez/266	97,46±0,77 <sup>a</sup>	97,61±0,56 <sup>a</sup>	97,61±0,56 <sup>a</sup>	97,46±0,77 <sup>a</sup>
	Fev/326	70,80±5,23 <sup>b</sup>	87,39±2,37 <sup>a</sup>	76,41±13,16 <sup>b</sup>	81,79±10,30 <sup>a</sup>
	Mar/359	89,79±4,71 <sup>b</sup>	95,73±0,88 <sup>a</sup>	94,11±1,40 <sup>a</sup>	91,41±7,00 <sup>b</sup>

Para cada efeito (local e tratamento), médias com letras diferentes na linha diferem significativamente pelo teste de Tukey ( $p<0,05$ ).

#### 4. DISCUSSÃO

Este estudo representa a primeira avaliação do desempenho zootécnico de ostras triploides (*Crassostrea gigas*) cultivadas em sistemas comerciais no Brasil.

#### 4.1 Crescimento em peso fresco total e altura

Analisando os dados da biometria 2 (fevereiro de 2014) do experimento II, pode-se notar que em ambos os locais de cultivo (BN e BS) as ostras 3N foram superiores às ostras 2N em peso fresco total e altura, quando estas apresentavam uma idade de aproximadamente 6 meses de cultivo, sendo verificado o mesmo padrão de desempenho zootécnico dos outros experimentos. Porém na última biometria (maio de 2014), não foram detectadas diferenças entre os locais e os tratamentos, indicando que as ostras 3N apresentam um desempenho zootécnico semelhante às ostras 2N em outras estações do ano. Essa característica poderá ser melhor entendida com a utilização de dados reprodutivos, como análises histológicas e índices de condição, em um próximo estudo.

As análises do peso fresco total e da altura apresentaram um padrão semelhante nas taxas de crescimentos obtidas para as ostras 2N e 3N durante os cultivos nos dois locais testados (BN e BS), sendo as ostras 2N superiores às ostras 3N entre 6-7 meses de cultivo, mas no momento das despescas (período de verão) as ostras 3N apresentaram maior peso fresco total e altura em relação às ostras 2N, demonstrando um melhor potencial zootécnico das ostras 3N para esse período do ano (experimento I). Esse fator já havia sido identificado em um dos primeiros trabalhos de análise de desempenho zootécnico em *Crassostrea gigas* realizados nos Estados Unidos por Allen e Downing (1986). Esses autores atribuíram a superioridade em peso e sobrevivência das ostras triploides ao fato delas utilizarem menos glicogênio para os processos de gametogênese e com isso terem uma quantidade maior de energia para os processos de crescimento.

Os resultados obtidos em outros estudos de campo com o cultivo de moluscos bivalves triploides são bastante conflitantes. Em alguns casos, os resultados de desempenho zootécnico para crescimento (peso fresco total e altura) foram melhores para organismos 3N do que para 2N, tais como em *Mytilus edulis* (Beaumont e Fairbrother 1991; Brake et al. 2004), *Argopecten ventricosus* (Verdugo et al. 2000), *Pecten maximus* (Beaumont e Fairbrother 1991) e *C. gigas* (Wang et al. 2003). Porém, em outros exemplos não foram encontradas diferenças significativas entre as duas variedades de ploidia como *Crassostrea virginica* (Stanley et al. 1984) e *C. gigas* no primeiro ano de cultivo (Allen e Downing 1986).

Dentre os autores que obtiveram resultados semelhantes ao presente estudo podemos citar Stone et al. (2013), que trabalhando com variedades de ostras 2N e 3N da espécie *C. virginica*, cultivadas em seis diferentes locais da Carolina da Sul – EUA, verificaram que as ostras 3N

foram superiores em peso fresco total e altura às ostras 2N em ambos locais de cultivo, ao final do experimento. Já Harding (2007), trabalhando com a espécie *C. virginica* 2N e 3N, obteve resultados expressivos no aumento do ganho de peso fresco total e altura, alcançando as ostras 3N o tamanho de mercado 3 meses antes que as ostras 2N. Dégremont et al. (2012) realizaram um experimento em três diferentes locais de cultivo no leste dos EUA, comparando ostras 2N e 3N da espécie *C. virginica* e obtiveram resultados em que o peso fresco total e a altura das ostras 3N foram superiores às ostras 2N ao final do experimento.

Ainda com relação ao crescimento em peso fresco total e altura, Goulletquer et al. (1996) avaliaram o desempenho de ostras do Pacífico 3N em ecossistema com alta produtividade primária e encontraram desempenho superior às ostras 2N. Nell e Perkins (2005) verificaram que as ostras *Crassostrea gigas* 3N, cultivadas em áreas com alta produtividade primária crescem melhor, enquanto que em áreas com pouca produtividade primária não há diferença entre animais 3N e 2N. De acordo com Mizuta et al (2012) e Ferreira et al. (2006) as características ambientais dos locais utilizados em nossos estudos assemelham-se bastante às características citadas anteriormente, com ambientes de alta produtividade primária, o que pode ter auxiliado na superioridade encontrada, tanto em peso fresco total quanto em altura, das ostras 3N em relação aos seus controles 2N.

Contudo, Garnier-Gere et al. (2002) observaram que em ambientes com pouca produtividade primária, as ostras 2N e 3N da espécie *Crassostrea gigas* não apresentaram diferença em altura, somente em peso fresco total. A diferença apresentada em peso fresco total está, provavelmente, relacionada com o fato delas não desovarem, enquanto a diferença em altura pode estar vinculada à disponibilidade e assimilação de nutrientes.

No Brasil a maior parte da comercialização das ostras produzidas ocorre durante o período de verão, tornando-se uma alternativa bastante atraente para a cadeia produtiva, com a utilização de organismos triploides que apresentam características zootécnicas superiores aos organismos normalmente utilizados (diploides). Por último, vale citar que nos três experimentos as ostras de ambos os locais e tratamentos alcançaram uma altura média de 7 cm, com um tempo de cultivo de apenas 207, 175 e 163 dias, respectivamente.

Nas comparações entre ganho em peso fresco total e altura, a BS apresentou os melhores resultados de cultivo, principalmente nas fases finais da produção. Esta região da ilha de Santa Catarina representa um forte elo da cadeia produtiva do estado, tendo em vista que a BS abriga

61,48% de toda ostra do Pacífico produzida no Brasil, comprovando que as características apresentadas neste local são de grande importância para a cadeia produtiva nacional (Epagri, 2015).

Vale ressaltar que ostras triploides utilizadas no primeiro experimento provinham de uma indução direta à triploidia, ou seja, a partir do cruzamento entre fêmeas diploides (nacional) e machos tetraploides. Mesmo não possuindo uma coadaptação genética ao ambiente em que foram cultivadas, sendo que 66,66% de sua genética provinha do Chile, essas ostras apresentaram superioridade de ganho em peso fresco total e altura em relação às ostras diploides.

Apesar de não haver uma comparação direta entre os três experimentos, pode-se observar melhorias no ganho zootécnico (peso fresco total e altura) das ostras triploides cultivadas no Sul do Brasil, principalmente no momento da despesca, tanto para triploides por indução direta no experimento I, quanto para indução indireta no experimentos II.

Esses resultados podem proporcionar uma melhor opção ao produtor em relação ao momento da despesca desses organismos, sendo que os animais 2N mais indicados para serem comercializados entre o outono e a primavera e os animais 3N durante o período de verão, época em que esses animais apresentam realmente uma superioridade em peso fresco total e altura em relação às ostras normais (2N).

#### 4.2 Sobrevivência

No experimento II obtivemos os melhores resultados de sobrevivência, sendo as ostras 3N superiores em ambos os locais de cultivo às ostras 2N. Esse fato pode estar relacionado ao momento em que ocorreu a despesca, em maio de 2014, período de outono no Brasil e momento em que as ostras 2N sobreviventes encontravam-se com menor peso fresco total em relação às ostras 3N. Já nos experimentos I e III, as despescas ocorrem em março de 2014 e março de 2016, respectivamente, fim do período de verão. Nos experimentos I e III a BS foi superior a BN em relação à sobrevivência, sendo as ostras 3N superiores as 2N no momento da despesca apenas no experimento I. No experimento II na biometria 2 (período de verão), as ostras 3N apresentaram uma sobrevivência superior ( $p < 0,05$ ) às ostras 2N, demonstrando uma característica de interesse para a cadeia produtiva dessa região, tendo em vista que a maior parte da comercialização de ostras nessa região ocorre nesta época do ano.

A sobrevivência das ostras 3N nos três experimentos demonstrou o potencial desses animais para o cultivo no Brasil, sendo indicadas para futuros cultivos aos quais os períodos de despesca coincidam com os utilizados nos experimentos de cultivos (I e III), ou seja, próximas ao período de verão.

Com relação às taxas de sobrevivência obtidas em ostras 3N adultas, os resultados de sobrevivência obtidos na bibliografia, quando comparados às ostras 2N, também variam (Goulletquer et al. 1996; Gagnaire et al. 2006). Porém, há indicativos de que as ostras 3N sejam menos sensíveis a fatores abióticos (Duchemin et al. 2007).

Ostras 2N geralmente apresentam maiores taxas de mortalidade durante o período de desova (Gagnaire et al. 2006). Como as ostras 3N possuem uma baixa capacidade reprodutiva, esse efeito é diminuído e as menores taxas de mortalidade têm sido geralmente encontradas para as 3N em relação às 2N (Hand et al. 1998; Nell e Perkins 2005; Gagnaire et al. 2006).

Comparando o desempenho de 2N e 3N em ostras *Saccostrea commercialis*, Nell et al. (1994), encontraram maior nível de glicogênio nas ostras 3N. Hawkings et al. (1994) e Magoulas et al. (2000) demonstraram que a maior heterozigotidade de indivíduos 3N permite a manutenção do metabolismo basal com menor gasto energético. O menor custo metabólico em relação aos indivíduos 2N também confere maior resistência dos indivíduos 3N a condições de estresse (Garnier-Gere et al. 2002) e este fator pode ter contribuído para a superioridade na sobrevivência das ostras 3N em relação às ostras 2N.

Outro fator que pode auxiliar na explicação desses resultados é o fato de que a redução da gametogênese contribua diretamente para o crescimento mais acelerado e ainda uma melhoria na sobrevivência das ostras 3N, permitindo uma reorientação na distribuição energética da reprodução para o crescimento, principalmente nos períodos de verão (Allen e Downing 1991). Para a confirmação dessas características, outros estudos devem ser elaborados com a utilização de análises quantitativas (índice de condição) e qualitativas (histologia) buscando um melhor entendimento sobre os aspectos reprodutivos de ostras triploides produzidas e cultivadas no Brasil.

Tendo em vista que a maior demanda pelo produto ocorre no período de verão, época em que ocorreram as despesas das ostras nos experimentos I e III e no experimento II (biometria 2-período de verão), os resultados sugerem potencial para utilização das ostras 3N em cultivos comerciais no sul do Brasil.



## 5. REFERÊNCIAS

- Allen JSK, Downing SL. 1986. Performance of triploid Pacific oysters, *Crassostrea gigas* (Thunberg): I. Survival, growth, glycogen content, and sexual maturation in yearlings. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 102: 197-208.
- Allen JSK, Downing SL. 1990. Performance of triploid Pacific oysters, *Crassostrea gigas*: Gametogenesis. *Canadian Journal of Fish Aquatic Sciences.* 47: 1213-1222.
- Allen JSK, Downing SL. 1991. Consumers and experts alike prefer the taste of sterile triploid over gravid diploid Pacific oysters (*Crassostrea gigas*, Thunberg). *J. Shellfish Res.* 10: 19-22.
- Beaumont AR, Fairbrother JE. 1991. Ploidy manipulation in molluscan shellfish: a review. *Journal Shellfish Research.* 10: 1-18.
- Brake J, Davidson J, Davis J. 2004. Field observation on growth, gametogenesis, and sex ratio of triploid and diploid *Mytilus edulis*. *Aquaculture.* 236: 179-191.
- Brasil, Ministério da Pesca e Aquicultura. 1<sup>o</sup> Anuário Brasileiro da Pesca e Aquicultura. Brasília, 2014. 136p
- Cheney DP, Macdonald BF, Elston RA. 2000. Summer mortality of Pacific oysters, *Crassostrea gigas* (Thunberg): Initial findings on multiple environmental stressors in Puget Sound, Washington, 1998. *Journal Shellfish Research.* 19: 353-359.
- Dégremont MB, Garcia C, Frank-Lawale A, Allen JSK. 2012. Triploid oysters in the Chesapeake bay: Comparison of diploid and triploid *Crassostrea virginica*. *Journal of Shellfish Research.* 31: 21-31.
- Duchemin MB, Fournier M, Auffret M. 2007. Seasonal variations of immune parameters in diploid and triploid Pacific oysters, *Crassostrea gigas* (Thunberg). *Aquaculture.* 264: 73-81.
- Epagri, 2015. Síntese Informativa da Maricultura de Santa Catarina em 2014. Disponível em: <http://www.epagri.sc.gov.br>. Acesso: 06 de maio de 2016.

Eudeline B, Allen JSK, Guo X. 2000. Optimization of tetraploid induction in Pacific oysters, *Crassostrea gigas*, using first polar body as a natural indicator. *Aquaculture*. 187: 73-84.

FAO, 2012. The state of world fisheries and aquaculture. Rome, 209p.

FAO, 2014. The state of world fisheries and aquaculture. Rome, 243p.

Ferreira JF, Besen K, Wormsbecher AG, Santos RF. 2006. Physical-chemical parameters of seawater mollusc culture sites in Santa Catarina-Brazil. *Journal of Coastal Research*. 2: 1122-1126.

Garniere-Gere PH, Naciri-Graven Y, Bougrier S, Magoulas A, Heral M, Kotoulas G, Hawkins A, Gérard A. 2002. Influences of triploidy, parentage and genetic diversity on growth of the Pacific oyster *Crassostrea gigas* reared in contrasting natural environments. *Mol. Ecol.* 11: 1499-1514.

Gagnaire B, Soletchnik P, Madec P, Geairon P, Le Moine O, Renault T. 2006. Diploid and triploid Pacific oysters, *Crassostrea gigas* (Thunberg), reared at two heights above sediment in Marennes-Oleron Basin, France: difference in mortality, sexual maturation and hemocyte parameters. *Aquaculture*. 254: 606–616.

Goulletquer P, Joly J, Gérard A. 1996. Performance of triploid Pacific oysters *Crassostrea gigas* (Thunberg) reared in high carrying capacity ecosystem: survival, growth and proximate biochemical composition. *Haliotis*. 25: 1-12.

Goulletquer P, Soletchnik P, Le Moine O, Razet D, Geairon P, Faury N, Taillade S. 1998. Summer Mortality of the Pacific Cupped Oyster *Crassostrea gigas* in the Bay of Marennes-Oleron (France). ICES Mariculture Committee CM, Copenhagen. pp.14-21.

Guo X, Allen JSK. 1994. Reproductive potencial and genetcs of triploid Pacific oysters, *Crassostrea gigas* (Thunberg). *The Biological Bulletin*. 187: 309-318.

Guo X, Debrosse GA, Allen JSK. 1996. All-triploid Pacific oysters (*Crassostrea gigas* Thunberg) produced by mating tetraploids and diploids. *Aquaculture*. 142: 149-161.

Hand RE, Nell JA, Maguire GB. 1998. Studies on triploid oysters in Australia. X. Growth and mortality of triploid Sydney rock oysters *Saccostrea commercialis* (Iredale and Roughley). Journal of Shellfish Research. 17: 1115-1127.

Harding JM. 2007. Comparison of growth rates between diploid Deby Eastern oysters (*Crassostrea virginica*, Gmelin 1791), triploid Eastern oysters, and triploid Suminoe oysters (*Crassostrea ariakensis*, Fugita 1913). Journal of Shellfish Research. 26: 961-972.

Hawkins AJS, Day AJ, Gérard A, Naciri Y, Ledu C, Bayne BL, Heral M. 1994. A genetic and metabolic basis for faster growth among triploids induced by blocking meiosis I but not meiosis II in the larviparous European flat oyster, *Ostrea edulis* L. J. Exp. Mar. Biol. Ecol. 184: 21-40.

Lopes GR, Gomes CHAM, Tureck CR, Melo CMR. 2013. Growth of *Crassostrea gasar* cultured in marine and estuary environments in Brazilian waters. Pesquisa Agropecuária Brasileira. 48: 975-982.

Magoulas A, Kotoulas G, Gérard A, Naciri Y, Dermitzakis E, Hawkins AJS. 2000. Comparison of genetic variability and parentage in different ploidy classes of the Japanese oyster *Crassostrea gigas*. Genetic Research. 76: 261-272.

Mallia, JV, Muthiah, P, Thomas CP. 2005. Growth of triploid oyster, *Crassostrea madrasensis* (Preston). Aquaculture Research. v.37, p.718-724.

Melo EMC, Gomes CHAM, Silva FC, Sühnel S, Melo CMR. 2015. Chemical and physical methods of triploidy induction in *Crassostrea gigas* (Thunberg 1793). Scientific Journal of Fisheries, Aquaculture and Limnology. 41: 889-898.

Mizuta DD, Silvera JN, Fischer CE, Lemos D. 2012. Interannual variation in commercial oyster (*Crassostrea gigas*) farming in the sea (Florianópolis, Brazil, 27°44' S; 48°33' W) in relation to temperature, chlorophyll a and associated oceanographic conditions. Aquaculture. 366-367: 105-114.

Nell JA, Cox E, Smith IR, Maguire GB. 1994. Studies in triploid oysters in Australia: I. The farming potential of triploid Sydney rock oysters *Saccostrea commercialis* (Iredale and Roughley). *Aquaculture*. 126: 243-255.

Nell JA. 2002. Farming triploid oysters. *Aquaculture*. 210: 69-88.

Nell JA, Perkins B. 2005. Studies on triploid oysters in Australia: farming potential of all-triploid Pacific oysters, *Crassostrea gigas* (Thunberg), in Port Stephens, New South Wales, Australia. *Aquaculture Research*. 6: 530-536.

Normand J, Ernande B, Haure J, McCombie H, Boudry P. 2009. Reproductive effort and growth in *Crassostrea gigas*: comparison of young diploid and triploid oysters issued from natural crosses or chemical induction. *Aquatic Biology*. 7: 229-241.

Piferrer F, Beaumont A, Falguière J, Flajshans M, Haffray P, Colombo L. 2009. Polyploid fish and shellfish: Production, biology and applications to aquaculture for performance improvement and genetic containment. *Aquaculture*. 29: 125-156.

SAS Institute Inc. 2003. SAS OnlineDoc® 9.1. Cary, NC: SAS Institute Inc.

Samain J.F, McCombie H. 2008. Summer mortality of Pacific oyster *Crassostrea gigas*. The Morest Project. pp. 379.

Stanley JG, Hidu H, Allen JSK. 1984. Growth of American oyster increased by polyploidy induced by blocking meiosis I but not meiosis II. *Aquaculture*. 37: 147-155.

Stone BW, Hadley NH, Smith PRK. 2013. Evaluating the potential growth advantage of triploid eastern oysters (*Crassostrea virginica*) in South Carolina relative to commercially cultured diploid native stocks. *Journal of Shellfish Research*. 32: 647-655.

Verdugo CAR, Ramirez JL, Allen JSK, Ibarra AM. 2000. Triploid Catarina scallop (*Argopecten ventricosus* Sowerby II, 1842): growth, gametogenesis, and suppression of functional hermaphroditism. *Aquaculture*. 186: 13-32.

Wang Z, Li Y, Yu R, Gao Q, Tian C, Zheng X, Wang R. 2003. Growth comparison between triploid and diploid Pacific oyster during the reproductive season. *Am Fish Soc Symp.* 38: 285-289.

Walton WC, Rikard FS, Chaplin GI, Davis JE, Arias CR, Supan JE. 2013. Effects of ploidy and gear on the performance of culture oysters *Crassostrea virginica*: Survival, growth, shape, condition index and vibrio abundances. *Aquaculture.* 414-415: 260-266.

## MATERIAL SUPLEMENTAR

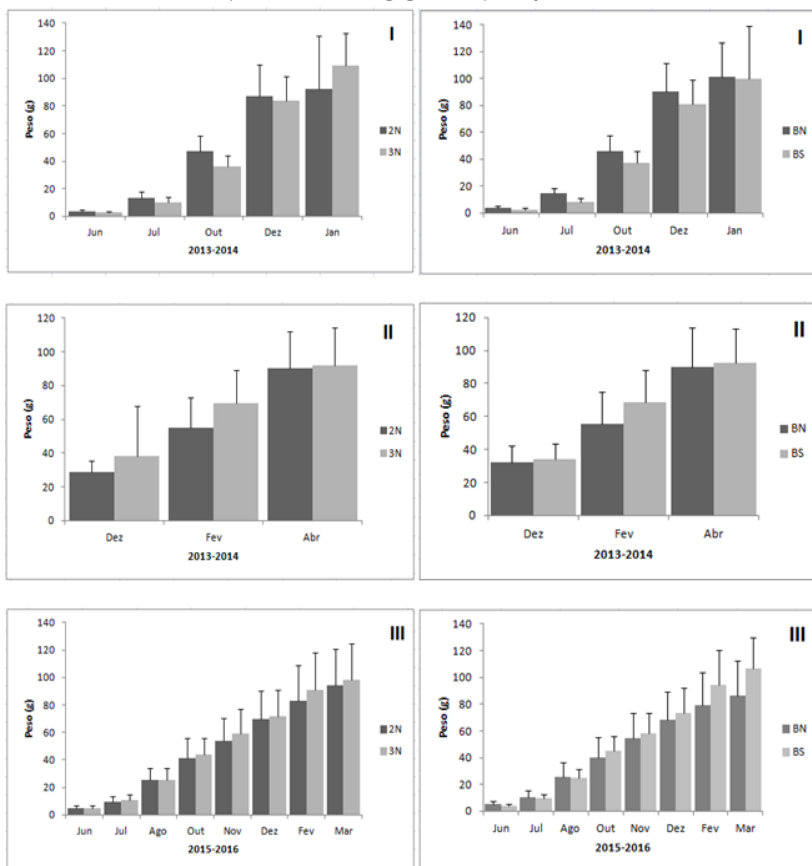


Figura 2 Suplementar. Peso vivo total (g) para os tratamentos diploides (2N) e triploides (3N), cultivados nos locais da Baía Norte (BN) e na Baía Sul (BS). Experimentos I, II e III.

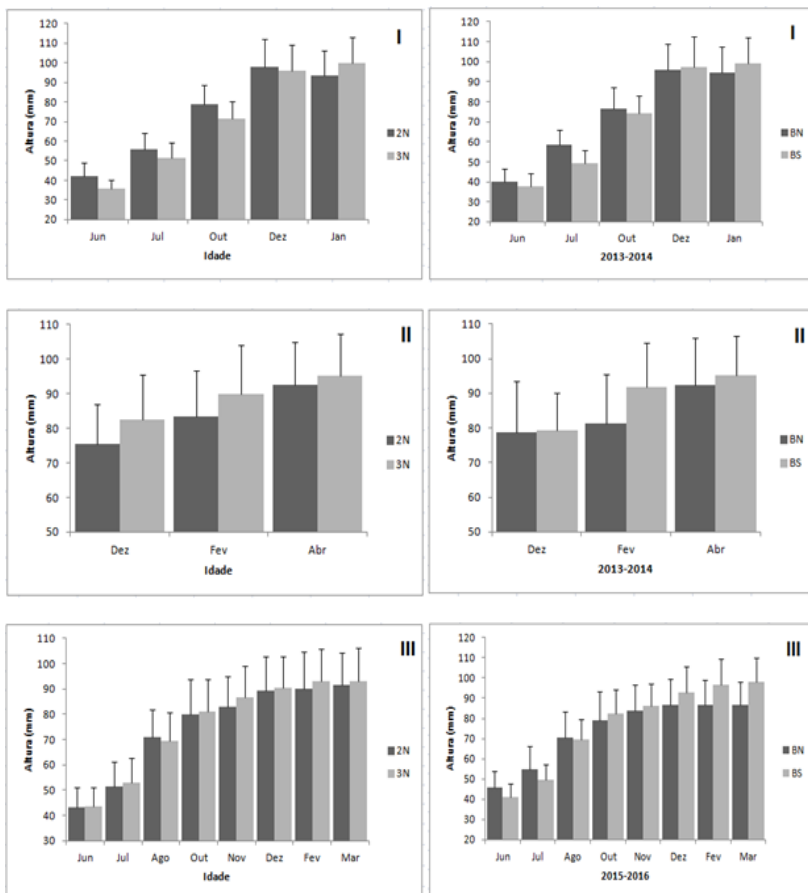


Figura Suplementar 3. Altura (mm) para os tratamentos diploides (2N) e triploides (3N), cultivados nos locais da Baía Norte (BN) e na Baía Sul (BS). Experimentos I, II e III.

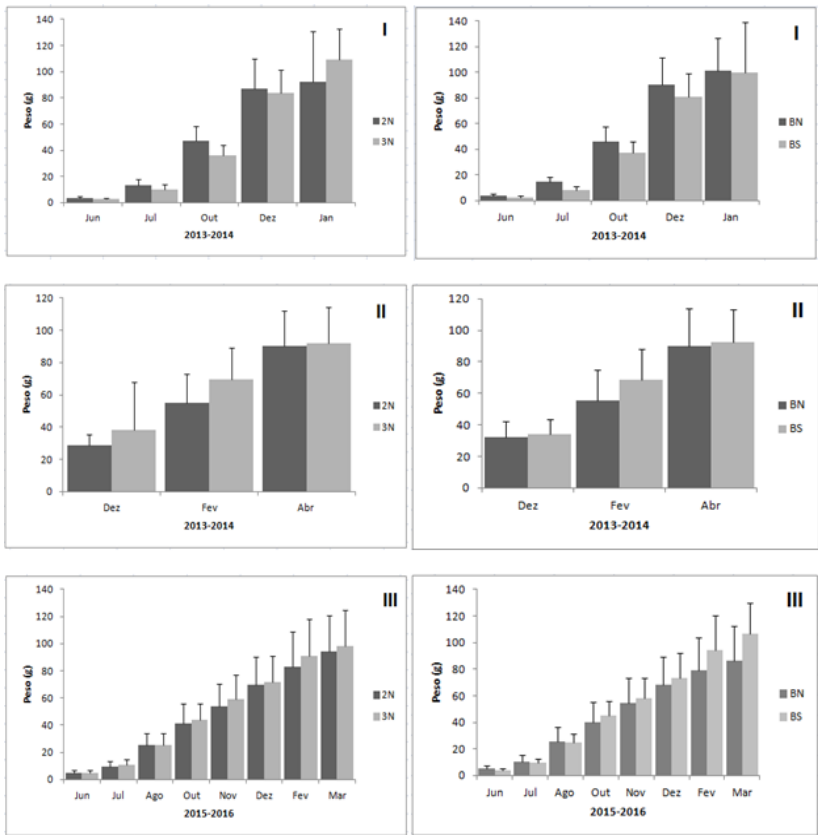


Figura Suplementar 4. Sobrevivência (%) para os tratamentos diploides (2N) e triploides (3N), cultivados nos locais da Baía Norte (BN) e na Baía Sul (BS). Experimentos I, II e III.



**ARTIGO III. ASPECTOS REPRODUTIVOS DE OSTRAS  
(*Crassostrea gigas*, THUNBERG 1793) TRIPLOIDES  
CULTIVADAS EM SANTA CATARINA**

O artigo será enviado para publicação no periódico Latin American Journal of Aquatic Research, sendo redigido segundo as normas da referida revista científica

Análise dos aspectos reprodutivos de ostras (*Crassostrea gigas*) triploides cultivadas em Santa Catarina

Emílio Mateus Costa MELO, Simone SÜHNEL, Gabriela Costa BACHI, Ana Cristina Santos OLIVEIRA, Brenda de Oliveira LOPES, Claudio Manoel Rodrigues de MELO

*Federal University of Santa Catarina (UFSC), Laboratory of Marine Molluscs. Rua dos Coroaes, 503 – Barra da Lagoa – CEP: 88061-600 – Florianópolis – SC – Brazil. e-mail: efwp@yahoo.com.br (corresponding author)*

## RESUMO

O experimento de cultivo de ostras diploides (2N) e triploides (3N), foi proposto com o objetivo de identificar, por análises quantitativas (IC) e qualitativas (histologia), as diferenças apresentadas entre ostras diploides (2N) e triploides (3N) quanto aos seus aspectos reprodutivos durante o período de verão (2015-2016). Foram realizadas 6 biometrias (08/2015-03/2016) para IC e 7 biometrias para histologia (12/2015-03/2016). Os resultados obtidos para IC apresentaram diferença significativa entre os tratamentos apenas na biometria I, sendo as ostras 3N superiores às ostras 2N. Nas outras biometrias os resultados foram semelhantes para as duas ploidias. Os resultados das análises histológicas apresentaram diferenças ( $p < 0,05$ ) entre os tratamentos nas biometrias 1 e 7, sendo na biometria 1 observado o estágio de pré-desova em ambas as ploidias, a desova para ostras 2N e repouso apenas para ostras 3N. Na biometria 7 em ambos os tratamentos foi observado os estágios de desova. Foi observada uma grande semelhança entre o ciclo reprodutivo das ostras 2N e 3N durante o período de verão, o que sugere que os potenciais ganhos obtidos com a utilização de ostras 3N no Brasil não estão relacionados aos aspectos reprodutivos e sim a outros fatores que precisam ser melhor avaliados.

## 1. INTRODUÇÃO

As ostras do gênero *Crassostrea* são organismos dioicos, não apresentam dimorfismo sexual aparente, tornando necessárias análises microscópicas e/ou histológicas para identificação desses organismos quanto a sua sexualidade (Galtsoff, 1964; Gosling, 2003).

A reprodução em moluscos bivalves é controlada por uma interação complexa de fatores endógenos e exógenos. Os fatores endógenos estão ligados à genética dos organismos e aos ciclos neuro-endócrinos. Os fatores exógenos estão relacionados a fatores ambientais como disponibilidade de alimento, temperatura, salinidade, entre outros (Gosling, 2003; Mackie, 1984). Dentre esses fatores, a temperatura apresenta-se como um dos mais importantes para regulação dos processos reprodutivos em moluscos bivalves.

Uma das técnicas mais utilizadas para controle dos processos reprodutivos em moluscos bivalves é triploidização, já bastante difundida em vários países do mundo como EUA (Stone et al., 2013; Dégremont et al., 2012; Walton et al., 2013), Austrália (Nell & Perkins, 2005), França (Gagnaire et al., 2006; Jouaux et al., 2010) e México (Verdugo et al., 2000), entre outros. Esta técnica surgiu no início da década de 1980, nos

EUA com a espécie *Crassostrea virginica* (Gmelin, 1791) com os trabalhos de Stanley et al. (1981), tendo como principal objetivo a supressão da reprodução desses organismos. O conjunto adicional de cromossomos pode interferir nos processos reprodutivos, tais como nas divisões celulares que dependem do número de cromossomos (Jouaux et al., 2010), dificultando a reprodução desses organismos.

Apesar de se provocar uma grande redução nos processos reprodutivos em ostras, a triploidia não garante a esterilidade total desses organismos (Piferrer et al., 2009) e, em alguns casos sua capacidade reprodutiva são comparadas aos organismos diploides normais (Shpiguel et al., 1992; Normand et al., 2008; Guo & Allen, 1994; Eudeline et al., 2000; Jouaux et al., 2010).

Existem muitas características zootécnicas que podem ser aprimoradas a partir da supressão da reprodução em ostras, tais como a manutenção da qualidade e sabor do produto durante todo ano (Allen & Downing, 1990 & 1991, Nell, 2002), melhorias nos aspectos zootécnicos como crescimento (Normand et al., 2009) e sobrevivência (Nell & Perkins, 2005).

Como essas características estão relacionadas ao ciclo reprodutivo de moluscos bivalves, torna-se necessária a utilização de métodos que verifiquem o desenvolvimento do ciclo reprodutivo de ostras diploides (2N) e triploides (3N), expostas às condições de cultivo no sul do Brasil. Para tanto, a utilização de métodos quantitativos e qualitativos para determinação das características reprodutivas dos moluscos bivalves tornam-se necessários.

Dentre os métodos qualitativos, o mais utilizado é a análise histológica, classificando as ostras a partir das características das células do tecido gonádico nos diferentes estágios de desenvolvimento, porém este método é subjetivo e deve ser acompanhado pelos métodos quantitativos para uma melhor análise (Gosling, 2003).

O método quantitativo para análise do desenvolvimento reprodutivo de moluscos bivalves mais utilizado é a análise do índice de condição (IC), podendo ser avaliado de forma indireta o estágio reprodutivo dos animais (Rabelo et al., 2005). Contudo, em ostras, elevados valores de IC podem indicar alta quantidade de glicogênio (Galtsoff, 1964).

Com a possível inclusão de ostras do Pacífico triploides na cadeia produtiva da ostreicultura no Brasil, torna-se necessário a avaliação de seus aspectos reprodutivos a fim de se verificar se os ganhos alcançados por essa melhoria genética estão relacionados a supressão da reprodução destes organismos. Para tanto, o presente estudo tem como objetivo

identificar, por análises quantitativas (IC) e qualitativas (histologia), durante um ciclo de cultivo entre agosto de 2015 e março de 2016, as diferenças apresentadas por organismos diploides e triploides quanto aos seus aspectos reprodutivos.

## 2. MATERIAIS E MÉTODOS

### 2.1 Localização e parâmetro ambiental

O experimento de cultivo de ostras da espécie *C. gigas* foi realizado em dois ambientes de cultivo (Figura 1), na Ilha de Santa Catarina, na Baía Norte da Ilha (BN), área de cultivo experimental do Laboratório de Moluscos Marinhos da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC), Sambaqui (27°28'30"S; 48°33'40"W) e, na Baía Sul da Ilha (BS), área de cultivo comercial da Fazenda Marinha Paraíso das Ostras, Caieira da Barra do Sul (27°49'0"S; 48°33'50"W).

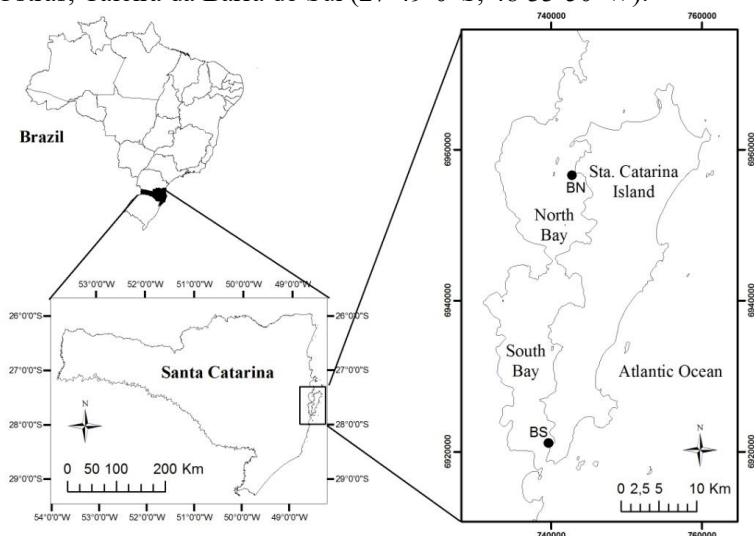


Figura 1. Localização dos pontos de instalação das unidades experimentais para a avaliação do desempenho zootécnico de ostras. BN=Baía Norte e BS=Baía Sul

Durante o período experimental, a temperatura da água do mar foi registrada a cada hora através de um sensor *Tidbit Temp Logger* fixado nas estruturas de cultivo de ambas as baías.

## 2.2 Obtenção de sementes de ostras diploides e triploides

As sementes de ostras *C. gigas* diploides (2N) e triploides (3N) foram produzidas a partir do sacrifício dos reprodutores 2N com um ano de idade, para retirada dos gametas e posterior fertilização (Melo et al., 2015), no Laboratório de Moluscos Marinhos da Universidade Federal de Santa Catarina (LMM-UFSC) (27°35'0"S; 48°26'28"W). As ostras 2N e 3N foram produzidas a partir dos mesmos reprodutores, sendo que as ostras 2N não sofreram nenhuma indução (controle) e as ostras 3N foram expostas a um processo de indução química indireta com a utilização do 6-dimetilamino-purina (6-DMAP) a partir da metodologia descrita por Melo et al. (2015).

## 2.3 Experimento de cultivo

O manejo dos animais durante o período de cultivo experimental foi semelhante ao utilizado por produtores comerciais de ostras *C. gigas* no estado de Santa Catarina. Brevemente, o manejo das ostras foi composto pela limpeza das lanternas berçários quinzenalmente, das lanternas intermediárias e definitivas mensalmente (Tabela 1), com a utilização de jato de água sob pressão para remoção do lodo e as incrustações presentes nas ostras e nas estruturas de cultivo.

Foram realizadas 6 biometrias mensais (08/2015-03/2016) para análise do Índice de condição e 7 biometrias quinzenais durante o período de verão (12/2015-03/2016) para as análises histológicas. Previamente às biometrias, foi realizada a remoção manual, com a utilização de cutelos, dos incrustantes presentes nas ostras amostradas. O experimento teve início em agosto de 2015, com duração de aproximadamente 8 meses.

Tabela 1. Densidade de estocagem, tipo de lanterna e manejo das ostras em cada fase de cultivo.

Item	Fases			
	Semente	Juvenil	Adulto	Despesca
Tamanho (mm)	>3	>30	>50	70-120
Densidade/andar	1000	200	80	60
Tipo de Lanterna	Berçário	Intermediária	Definitiva	Definitiva
Malha da Lanterna	2	20	40	40
Manejo (Intervalo em dias)	15	30	30	30

## 2.4 Índice de Condição

O índice de condição (IC) foi calculado durante o período 27/8/2015 a 08/03/2016, quando as ostras apresentavam uma idade entre 163 e 356 dias, com amostras mensais. A cada biometria foram amostrados 60 animais/tratamento/local.

O índice de condição (IC) foi calculado usando a fórmula a seguir:

$$IC = \frac{\text{Peso Seco do Tecido(g)} \times 100}{\text{Peso vivo do animal} - \text{peso da concha seca}} \quad (1)$$

A carne e as conchas das ostras secas separadamente, em estufa a 60°C, por no mínimo de 12 h, conforme metodologia descrita por Crosby & Gale (1990).

## 2.5 Histologia

A análise de histologia foi realizada durante o período de verão entre os dias 02/12/2015 a 08/03/2016 coletando-se a cada biometria 10 animais por tratamento/local. Para o tratamento 3N, os animais coletados (BN e BS) foram submetidos previamente a análise de ploidia (10 animais), conforme método descrito a seguir, sendo utilizados para histologia aqueles animais que apresentaram resultado positivo para triploidia.

Para avaliação qualitativa do ciclo reprodutivo dos animais, foram realizadas análises histológicas de acordo com método adotado por Sünhel et al. (2010) e Legat (2015), a partir de corte da secção transversal do tecidos das ostras, incluindo o tecido gonádico fixado em solução de Davidson marinho por 48 horas, seguido de fixação em álcool 70°; desidratação em série alcoólica progressiva; diafanização em xilol; inclusão em parafina; secção de 5 µm; coloração com HHE.

As lâminas histológicas foram analisadas com auxílio de microscópio óptico para determinação sexual e do estágio sexual (Tabela 2).

## 2.6 Avaliação da ploidia

As análises das ploidias das ostras foram realizadas com a utilização de um Citômetro de Fluxo (Partec-PA). Para preparação das amostras, as ostras foram abertas e extraiu-se uma parcela com aproximadamente 1cm<sup>2</sup> das brânquias com o auxílio de um bisturi, sendo colocadas em becker de 5 mL, contendo 0,5 mL de solução de extração de núcleo (NaOH + HCl), por 5 minutos. Posteriormente, o material foi

filtrado em tela de 35  $\mu\text{m}$  e adicionado 1,5 mL de um corante específico DAPI (4,6-diamidino-2-fenilindole) à solução filtrada. As ostras 2N foram utilizadas como padrão para comparação entre as ploidias em ambas as fases de vida pesquisadas.

## 2.7 Análise Estatística

A análise dos índices de condição foram realizadas utilizando análise de variância. Os estágios sexuais foram comparados utilizando o teste Qui-quadrado. As análises foram realizadas com o pacote computacional SAS<sup>®</sup> (2003).

Tabela 2. Descrição histológica dos estágios e das fases do desenvolvimento gonádico no ciclo reprodutivo de exemplares adultos de ostras do Pacífico *Crassostrea gigas*, adaptado de Sühnel et al. (2010) e Legat, 2015.

<b>Estágios</b>	<b>Fêmeas</b>	<b>Machos</b>
Gametogênese	Presença de poucos oócitos, em diferentes tamanhos e estádios de desenvolvimento. As paredes dos folículos não estão justapostas, ocorrendo presença de tecido conjuntivo entre os folículos. Há espaços intrafoliculares, as paredes dos folículos são mais espessas e apresentam oogônias no lado interno.	Elevada presença de células germinativas junto à parede interna dos folículos. A quantidade de tecido conjuntivo decresce entre os folículos.
Pré-desova	Ocorre um número maior de folículos ao longo do campo visual da lâmina. As paredes dos folículos encontram-se justapostas, com maior dificuldade de diferenciação. Maior densidade de oócitos, alongados e extremamente compridos. Pouca presença de espaços intrafoliculares ou interfoliculares. Canal genital sem presença de oócitos.	Ocorre um número maior de folículos ao longo do campo visual da lâmina e a concentração de espermatozoides é mais elevada. As paredes dos folículos encontram-se justapostas, com maior dificuldade de diferenciação. Poucas células germinativas. Canal genital sem presença de espermatozoides



Continuação		
Estágio	Fêmeas	Machos
Desova	A maioria dos folículos apresentam paredes não completamente justapostas com formato irregular. Os oócitos são observados no lúmen e nos canais genitais. Alguns folículos apresentam células germinativas próximas a parede e/ou oócitos com formato alongado destacados da parede. Baixa presença de tecido conjuntivo	Paredes dos folículos não justapostas, com aspecto frouxo. Presença de espermatozoides nos canais genitais. Alguns folículos apresentam elevada concentração de espermatozoides com flagelos orientados para o lúmen
Repouso	Elevada presença de tecido conjuntivo interfolicular. Baixa presença de folículos com pequeno diâmetro. Ocorrência de raros gametas residuais que permitem a distinção entre os sexos ou ausência de folículos e de gametas, impossibilitando a distinção entre os sexos.	

### 3. RESULTADOS

#### 3.1 Fatores Ambientais

A temperatura da água foi semelhante nos dois locais de cultivo, ocorrendo um aumento gradativo da temperatura até a última coleta de dados no mês de março de 2016. Na Baía Norte, a temperatura variou de 24,38° a 28,32°C ( $26,16^{\circ} \pm 1,52^{\circ}\text{C}$ ) e na Baía Sul a temperatura da água variou entre 22,09° a 27,37°C ( $25,72^{\circ} \pm 1,81^{\circ}\text{C}$ ).

#### 3.2 Análise de Ploidia

A análise de citometria de fluxo apresentou uma quantidade de ostras triploides de 81% no início deste estudo, porém no período de verão, durante as análises de histologia, os resultados apresentaram ampla variação na quantidade de ostras triploides (Tabela 3).

Tabela 3. Percentual de ostras triploides, durante o período de verão (análises histológicas).

Data da análise	(%) ostras triploides
02/12/2015	45
17/12/2015	55
04/01/2016	45
18/01/2016	50
04/02/2016	25
18/02/2016	55
08/03/2016	75

#### 3.3 Índice de Condição

Os resultados para índice de condição (IC) apresentaram diferença ( $p < 0,05$ ) entre os locais nas biometrias 2, 3 e 5 e entre os tratamentos apenas na biometria 1 (Tabela 4). Na comparação entre os locais, houve diferença estatística nas biometrias 2 e 3 sendo o IC na BS superior à BN, respectivamente. Na biometria 5 a BN foi superior estatisticamente à BS. Em relação aos tratamentos apenas na biometria 1 houve diferença estatística, sendo as ostras 3N superiores às ostras 2N (Figura 2).

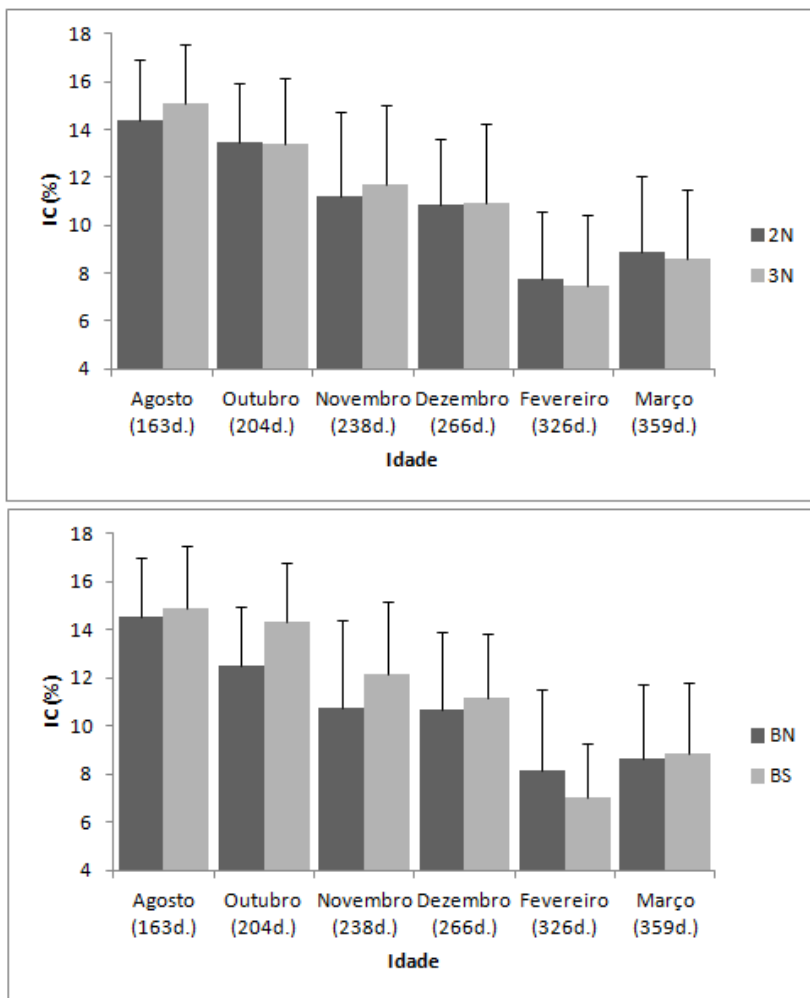


Figura 2. Índice de Condição (IC) médio das ostras diploides (2N) e triploides (3N), cultivadas na Baía Norte (BN) e Baía Sul (BS), ao longo dos meses de coleta. (d. = idade em dias)

Tabela 4. Médias de índice de condição (IC) de ostras *Crassostrea gigas* para os locais, Baía Norte (BN) e Baía Sul (BS) e para os tratamentos diploides (2N) e triploides (3N).

Biometrias/Idade (dias)	LOCAL		TRATAMENTOS	
	BN	BS	2N	3N
1/163	14,54±2,50 <sup>a</sup>	14,88±2,64 <sup>a</sup>	14,35±2,60 <sup>a</sup>	15,06±2,50 <sup>b</sup>
2/204	12,52±2,41 <sup>b</sup>	14,32±2,46 <sup>a</sup>	13,47±2,45 <sup>a</sup>	13,37±2,74 <sup>a</sup>
3/238	10,74±3,67 <sup>b</sup>	12,17±3,00 <sup>a</sup>	11,22±3,52 <sup>a</sup>	11,69±3,32 <sup>a</sup>
4/266	10,67±3,26 <sup>a</sup>	11,17±2,67 <sup>a</sup>	10,88±2,70 <sup>a</sup>	10,95±3,26 <sup>a</sup>
5/326	8,15±3,34 <sup>a</sup>	7,02±2,29 <sup>b</sup>	7,73±2,87 <sup>a</sup>	7,44±2,96 <sup>a</sup>
6/359	8,64±3,11 <sup>a</sup>	8,85±2,97 <sup>a</sup>	8,89±3,18 <sup>a</sup>	8,60±2,89 <sup>a</sup>

Para cada efeito (local e tratamento), médias com letras diferentes na linha diferem significativamente pelo teste de Tukey ( $p < 0,05$ ).

### 3.4 Histologia

A análise histológica dos animais foram observados os quatro estágios reprodutivos das ostras (*Crassostrea gigas*), gametogênese, pré-desova, desova e repouso no período estudado. Para ambos os estágios de pré-desova e desova foram observadas fases iniciais e avançadas de desenvolvimento de gametas. A proporção de machos e fêmeas (M: F) foi de 2,02: 1 nos animais 2N e de 2,42: 1 nos animais 3N. A porcentagem de hermafroditas foi de 3,02% e 1,67% para as ostras 2N e 3N, respectivamente (Tabela 5).

Tabela 5. Porcentagem e proporção sexual de exemplares de *Crassostrea gigas* diploides (2N) e triploides (3N).

Sexo	Sexagem (%) / Tratamento	
	2N	3N
Fêmeas	27,46	23,09
Macho	55,47	55,99
Indeterminado	14,13	19,48
Hermafrodita	3,02	1,67
Proporção machos e fêmeas	2,02M:1F	2,42M:1F

No início de dezembro de 2015, as ostras 2N encontravam-se, na sua maioria em um período de pré-desova, ocorrendo um pico de desova a partir de janeiro de 2016, sendo estes eventos registrados até o final de

fevereiro, onde as ostras 2N BS entraram em repouso e as ostras 2N BN apresentaram um processo de desova mais prolongada, até março de 2016 (Figura 3). Nos períodos de desova grande quantidade de tecido conjuntivo foi observado nas amostras histológicas, tanto para ostras 2N quanto para 3N.

Em relação às ostras 3N, estas se encontravam em período de pré-desova no início de dezembro de 2015 na BN e BS. Na segunda quinzena de dezembro as ostras 3N BS continuavam em sua grande maioria em pré-desova enquanto que as ostras 3N BN já apresentavam desova inicial (Figura 4). Na segunda quinzena de fevereiro, grande parte das ostras triploides estavam em período de repouso com presença elevada de tecido conjuntivo.

A avaliação estatística dos estágios sexuais demonstrou diferença significativa ( $p < 0,05$ ) entre os tratamentos (2N x 3N) somente na biometria 1 (início de dezembro) e 7 (início de março). Na biometria 1, o estágio de pré-desova foi observado em ambos os animais 2N e 3N (78,9% para 2N; e 85,7% para 3N, respectivamente), já o estágio de desova somente nos animais 2N (21,1%) e o de repouso nas ostras 3N (14,3%). Na biometria 7, ambos os tratamentos (2N e 3N) mostraram animais nos estágios de desova (44,4% para 2N; e 23,6% para 3N, respectivamente) e repouso (50% para 2N e 76,5% para 3N). Na biometria 7, 5,6% das ostras 2N começaram a mostrar início da gametogênese.

Avaliando o local do experimento (BN e BS), foi observada diferença significativa ( $p < 0,05$ ) somente na biometria 3, onde na BN a maior parte dos animais encontravam-se em estágio de desova 78,6% e 21,4% em gametogênese. Já os animais da BS 26,7% dos animais ainda encontravam-se em estágios de pré-desova, igual quantidade de animais nos estágios de desova (26,7%) e repouso (26,7%) e uma pequena quantidade iniciando a gametogênese (6,7%).

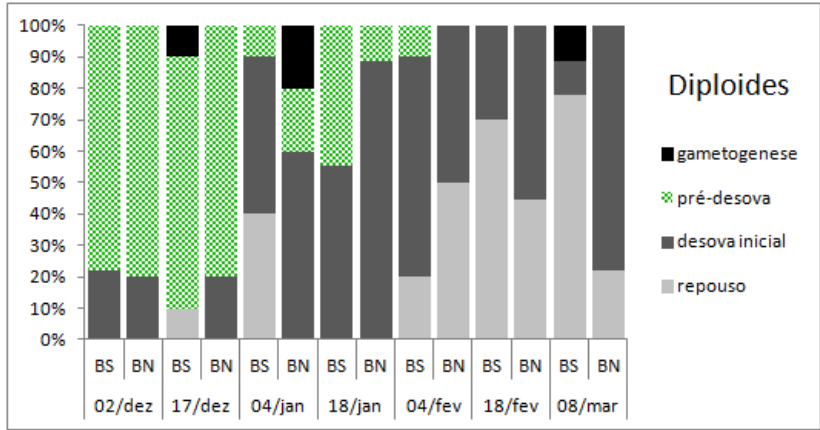


Figura 3. Estágios do ciclo reprodutivo observados para ostras diploides, na Baía Sul (BS) e Baía Norte (BN).

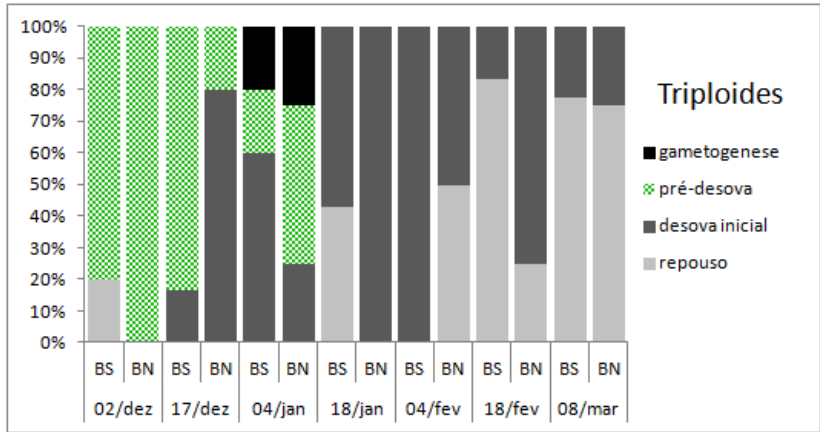


Figura 4. Estágios do ciclo reprodutivo observados para ostras triploides, na Baía Sul (BS) e Baía Norte (BN).

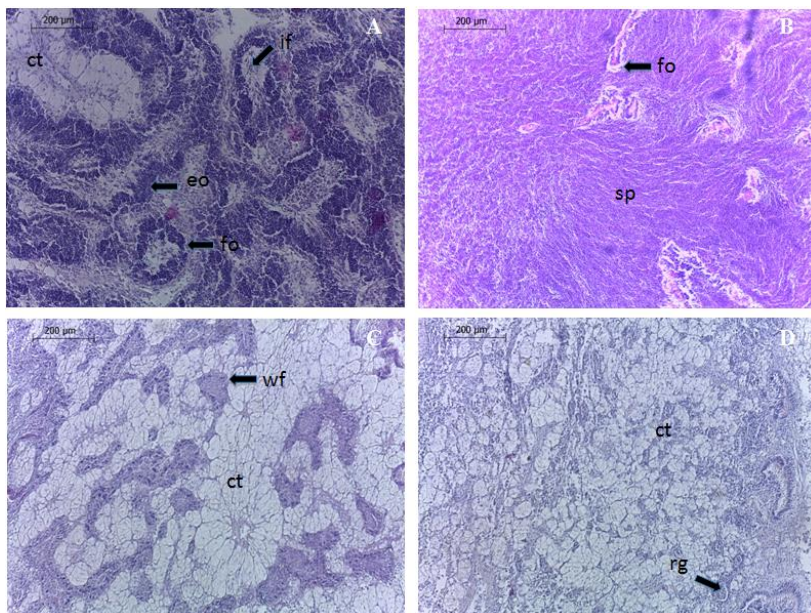


Figura 5. Secções histológicas do tecido gonádico de machos da ostra *Crassostrea gigas* diploides cultivadas. Detalhes do reprodutivo (A) gametogênese; (B) pré-desova; (C) desova; (D) repouso. ct: tecido conjuntivo; eo: espermatogônia; wf: parede do folículo; fo: folículo; sp:

espermatozoide; if: espaço intrafolicular; rg: gametas remanescentes. A barra representa 200  $\mu$ m.

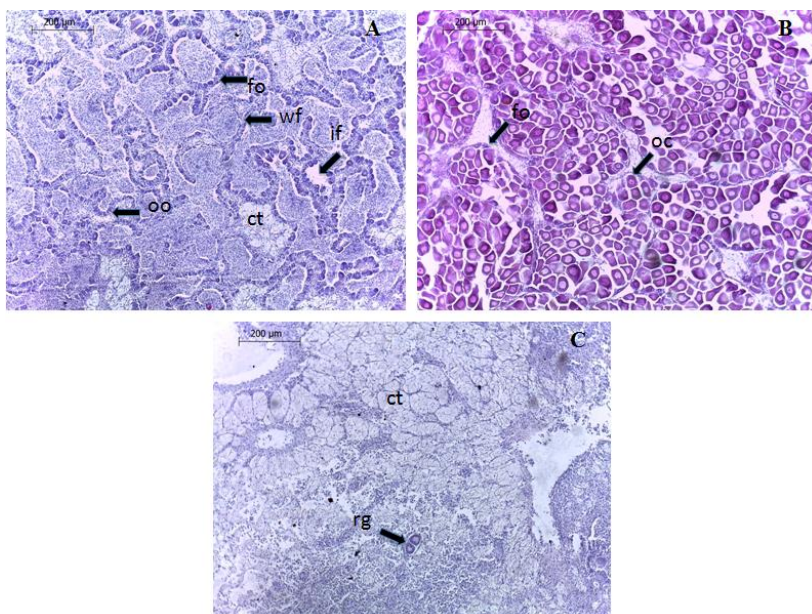


Figura 6. Secções histológicas do tecido gonádico de fêmeas da ostra *Crassostrea gigas* diploides cultivadas. Detalhes do reprodutivo (A) gametogênese; (B) pré-desova; (C) repouso. ct: tecido conjuntivo; oo: oogônia; wf: parede do folículo; fo: folículo; oc: oócito; if: espaço intrafolicular; rg: gametas remanescentes. A barra representa 200  $\mu$ m.

## 4. DISCUSSÃO

### 4.1 Índice de Condição

Os resultados de índice de condição das ostras (2N e 3N) no início de mês de agosto (163 dias de idade) foram os mais altos registrados, em ambos os locais de cultivo, havendo diferença significativa ( $p < 0,05$ ) entre os tratamentos apenas nessa biometria, onde o IC das ostras 3N foi superiores ao das ostras 2N.

Durante o período de verão o índice de condição alcançou seus menores valores para ambos os locais e tratamentos, principalmente no início de fevereiro (326 dias de idade), coincidindo com o período de desova observado pela análise histológica. Em março de 2016 (359 dias



de idade) o índice de condição voltou a aumentar para ambos os tratamentos. Este fato já havia sido relatado por Normand et al. (2008), onde as ostras *C. gigas* 2N e 3N apresentaram o mesmo padrão no índice de condição ao longo do período reprodutivo. Estes autores identificaram uma alta variação no esforço reprodutivo de ostras 3N, identificando em alguns triploides um padrão de desova semelhante ao observado em ostras 2N.

Normand et al. (2009) compararam o desenvolvimento reprodutivo em juvenis de ostras *C. gigas* 2N, 3N a partir de tetraploides e 3N por indução indireta com Citocalasina-B e identificaram que o esforço reprodutivo de ostras 3N nas fases iniciais da gametogênese podem chegar a metade do nível encontrado para ostras diploides, sendo que a energia utilizada para a reprodução em triploides pode ser significativa, embora a produção final de gametas seja muito baixa.

Shpigel et al. (1992), comparando o índice de condição de ostras *Crassostrea gigas* diploides e triploides, cultivadas em dois ambientes com temperatura de 8-15° C e a 30° C, também observaram um decréscimo no índice de condição com o aumento da temperatura. Esses autores observaram que em ambientes com temperaturas de 8-15° C o índice de condição das ostras diploides foi superior estatisticamente às ostras triploides, o que se inverteu quando comparadas as ploidias em ambientes com elevadas temperaturas, sendo as ostras triploides superiores nos índices de condição às ostras diploides. Os resultados apresentados por Shpigel et al. (1992) sugerem que as ostras triploides seriam mais tolerantes do que as diploides em ambientes com elevadas temperaturas, fato comum durante o verão no sul do Brasil, porém esse resultado não foi observado no presente estudo.

Walton et al. (2013) estudando diferentes sistemas de cultivo (gaiolas de fundo, long-line ajustável com bolsas, gaiolas flutuantes e bolsas flutuantes) encontraram um padrão parecido ao presente estudo em ostras da espécie *Crassostrea virginica*, onde o índice de condição das ostras 3N apresentaram resultados semelhantes aos encontrados para as ostras 2N, durante o período de verão, havendo diferença significativa apenas nas gaiolas de fundo.

## 4.2 Histologia

O padrão semelhante do ciclo reprodutivo de ostras diploides e triploides (*Crassostrea gigas*) durante o período de verão já havia sido identificado em outros estudos, como Guo & Allen (1994) e Normand et al. (2008).

Allen & Downing (1986) já haviam identificado os processos de desova em ostras do Pacífico triploides, porém neste caso os gametas liberados foram considerados inviáveis. Guo & Allen (1994) notaram uma grande variação no esforço reprodutivo entre espécimes de ostras triploides, sendo que enquanto algumas fêmeas triploides não apresentavam gametas maduros, outras chegaram a produzir até 21 milhões de gametas sendo estas equivalentes às ostras diploides do mesmo estudo.

Entretanto, Normand et al. (2008) obtiveram resultados semelhantes ao presente estudo, cultivando ostras diploides e triploides (*Crassostrea gigas*) durante um verão com elevadas temperaturas na França. Esses autores mediram o índice de condição e aspectos histológicos de ostras 2N e 3N e encontraram uma forte relação entre o elevado esforço reprodutivo de ostras triploides com o aumento da temperatura da água do mar de 14°C em julho para 22,4°C em agosto de 2003.

Jouaux et al. (2010) identificaram dois tipos diferentes de características reprodutivas em ostras triploides, sendo estas identificadas por triploides  $\alpha$  e  $\beta$ . As triploides  $\alpha$  apresentaram padrões de gametogênese muito semelhantes às ostras diploides, já as triploides  $\beta$ , eram praticamente estéreis com apenas alguns gametas prontos para a desova. Jouaux et al. (2010), encontraram uma ampla heterogeneidade em termos de estratégias reprodutivas entre ostras triploides, corroborando com os estudos de Guo & Allen, (1994). Essas diferenças reprodutivas entre as ostras triploides  $\alpha$  e  $\beta$  observadas por Jouaux et al. (2010) podem auxiliar na explicação dos resultados obtidos no presente estudo em relação aos ciclos reprodutivos de ostras diploides e triploides terem sido semelhantes.

A capacidade reprodutiva de ostras triploides é utilizada desde 1993 para a produção de ostras tetraploides (Guo & Allen, 1994). A partir desse fato a técnica foi otimizada pelo trabalho de Eudeline et al. (2000), com a utilização de uma única fêmea triploide, ao invés de um “pool” de gametas de várias fêmeas, aumentando com isso o sucesso nas induções.

Outro resultado obtido no presente estudo e também relatado por outros autores, foi uma elevada variação nos índices de ploidia de ostras triploides. O presente estudo iniciou com um índice de 81% de triploidia e variou entre 25% a 75% durante as etapas finais de cultivo, quando as ostras apresentavam entre 9 e 12 meses de vida, respectivamente. Brake et al. (2004) já havia relatado esse evento em *Mytilus edulis*, onde o estudo iniciou com 80% de triploidia e diminuiu para 10% e 23%, quando os organismos foram amostrados com 11 e 23 meses, respectivamente. Allen

et al. (1999) já havia sugerido a possibilidade de reversão de ostras do Pacífico triploides ao nível de diploides, sendo que essa mudança poderia ser amplificada devido à exposição desses organismos às condições de cultivo, principalmente para triploides induzidos quimicamente.

Este foi o primeiro estudo no Brasil a avaliar os aspectos reprodutivos de ostras do Pacífico (*Crassostrea gigas*) triploides, expostas às condições de cultivo. Os resultados sugerem que o ciclo reprodutivo de ostras diploides e triploides cultivadas no sul do Brasil apresentam padrões semelhantes de desenvolvimento, o que pode indicar que os potenciais ganhos obtidos com a utilização de organismos triploides não estão apenas ligados aos aspectos reprodutivos e sim a outros fatores que precisam ser melhor entendidos em posteriores estudos de campo.

## 5. BIBLIOGRAFIA

- Allen, J.S.K., Downing, S.L. 1986. Performance of triploid Pacific oysters, *Crassostrea gigas* (Thunberg): I. Survival, growth, glycogen content, and sexual maturation in yearlings. J. Exp. Mar. Biol. Ecol. 102: 197-208.
- Allen, J.S.K. & S.L. Downing. 1990. Performance of triploid Pacific oysters, *Crassostrea gigas*: Gametogenesis. Can. J. Fish Aquatic Sci., 47: 1213-1222.
- Allen, J.S.K. & S.L. Downing. 1991. Consumers and experts alike prefer the taste of sterile triploid over gravid diploid Pacific oysters (*Crassostrea gigas*, Thunberg). J. Shellfish Res., 10: 19-22.
- Allen, J.S.K., A., Howe, T. Gallivan, X., Guo & G. Debrosse. 1999. Genotype and environmental variation in reversion of triploid *Crassostrea gigas* to the heteroploid mosaic state. J. Shellfish Res. 18 (1): 293.
- Brake, J., J. Davidson & J. Davis. 2004. Field observation on growth, gametogenesis, and sex ratio of triploid and diploid *Mytilus edulis*. Aquac., 236: 179-191.
- Crosby, M. P. & D.L. Gale. 1990. A review and evaluation of bivalve condition index methodologies with a suggested standard method. J. Shellfish Res., 9: 233-237.

- Dégremont M.B., C. Garcia, A. Frank-Lawale & Allen JSK. 2012. Triploid oysters in the Chesapeake bay: Comparison of diploid and triploid *Crassostrea virginica*. J. Shellfish Res., 31: 21-31.
- Eudeline, B., J.S.K. Allen & X. Guo. 2000. Optimization of tetraploid induction in Pacific oysters, *Crassostrea gigas*, using first polar body as a natural indicator. Aquac., 187: 73–84.
- Gagnaire B, P. Soletchnik, P. Madec, P. Geairon, O. Le Moine & T. Renault. 2006. Diploid and triploid Pacific oysters, *Crassostrea gigas* (Thunberg), reared at two heights above sediment in Marennes-Oleron Basin, France: difference in mortality, sexual maturation and hemocyte parameters. Aquac., 254: 606–616.
- Gosling, E. Bivalve mollusks: biology, ecology and culture. Oxford: Fishing News Books, 2003. 455p
- Guo, X. & J.S.K. Allen. 1994. Viable tetraploids in the Pacific oyster (*Crassostrea gigas* Thunberg) produced by inhibiting polar body I in eggs from triploids. Mol. Mar. Biol. Biot., 3: 42-50.
- Jouaux, A., C.Heude-Berthlin, P. Soudaine, M. Mathieu & K. Kellner. 2010. Gametogenic stages in triploid oysters *Crassostrea gigas*: Irregular locking of gaonial proliferation and subsequent reproductive effort. J. Exp. Mar. Biol. Ecol. 395: 162-170.
- Landau, B. & X. Guo. 1999. Growth characteristics in triploid Pacific oysters — a new dimension. J. Shellfish Res. 18, 270–271.
- Legat, J.F.A. Reprodução e cultivo da ostra *Crassostrea gasar* (Adanson, 1757) nos estados do Maranhão e Santa Catarina. 2015, 120f. Tese (Doutorado em Aquicultura). Universidade Federal de Santa Catarina.
- Mackie, G. L. 1984. Bivalves. In: Tompa, A. S., Wilbur, K. M., Verdonk, N. H., Van den Biggelaar, J. A. M. The molusca, volume 7, Reproduction. Orlando: TOMPA, A. S.; VERDONK, N. H.; VAN DEN BIGGELAAR, J. A. M.. p.351-418.
- Melo, E. M. C., C.H.A.M. Gomes, F.C. Silva, S. Sühnel & C.M.R. Melo. 2015. Chemical and physical methods of triploidy induction in

- Crassostrea gigas* (Thunberg 1793). Scien. J. Fish. Aquac. Lim. 41: 889-898.
- Nell, J.A. 2002. Farming triploid oysters. Aquac., 210 (1-4): 69-88.
- Nell, J. A. & B. Perkins. 2005. Studies on triploid oysters in Australia: farming potential of all-triploid Pacific oysters, *Crassostrea gigas* (Thunberg), in Port Stephens New South Wales Australia. Aquac. Res., 35: 530-536.
- Normand, J., M.L. Pennec & P. Boudry. 2008. Comparative histological study of gametogenesis in diploid and triploid Pacific oysters (*Crassostrea gigas*) reared in an estuarine farming site in France during the 2003 heatwave. Aquac., 282: 124-129.
- Normand, J., B. Eenande, J. Haure, H. McCombie & P. Boudry. 2009. Reproductive effort and growth in *Crassostrea gigas*: comparison of young diploid and triploid oysters issued from natural crosses or chemical induction. Aquat. Biol., 7:229-241.
- Piferrer, F., A. Beaumont, J. Falguière, M. Flajshans, P. Haffray & L. Colombo. 2009 Polyploid fish and shellfish: Production, biology and applications to aquaculture for performance improvement and genetic containment. Aquac., 29 (3-4): 125-156.
- Rabelo, M.F., Amaral, M.C.R., Pfeiffer, M.C. 2005. Oyster condition index in *Crassostrea rhizophorae* (Guilding, 1828) from a heavy-metal polluted coastal lagoon. Braz. J. Biol., 65(2).
- SAS Institute Inc. 2003. SAS OnlineDoc® 9.1. Cary, NC: SAS Institute Inc.
- Shpigel, M., B.J. Barber & R. Mann. 1992. Effects of elevated temperature on growth, gametogenesis, physiology, and biochemical composition in diploid and triploid Pacific oysters: *Crassostrea gigas* Thunberg. J. Exp. Mar. Biol. Ecol. 161: 15-25.
- Stanley, J.G., J.S.K. Allen & H. Hidu. 1981 Polyploidy induced in the American oyster, *Crassostrea virginica*, with cytochalasin B. Aquac. 23(1-4): 1-10.

- Stone B.W., N.H. Hadley & P.R.K. Smith. 2013. Evaluating the potencial growth advantage of triploid eastern oysters (*Crassostrea virginica*) in South Carolina relative to commercially cultured diploid native stocks. *J. Shellfish Res.*, 32: 647-655.
- Sühnel, S., F. Lagreze, M. Bercht, J.F. Ferreira, A.L. Carneiro-Schaefer, A.E.M., Magalhães & M., Maraschin. 2010. Sexual stages of the female portion in the scallop *Nodipecten nodosus* (Linné, 1758) and astaxanthin quantity in each stage. *Braz. J. Biol.*, 70(3) 89-98.
- Verdugo C.A.R., J.L. Ramirez, J.S.K. Allen & A.M. Ibarra. 2000. Triploid Catarina scallop (*Argopecten ventricosus* Sowerby II, 1842): growth, gametogenesis, and suppression of functional hermaphroditism. *Aquac.*, 186: 13-32.
- Walton W.C., F.S. Rikard, G.I. Chaplin, J.E. Davis, C.R. Arias & J.E. Supan. 2013. Effects of ploidy and gear on the performance of culture oysters *Crassostrea virginica*: Survival, growth, shape, condition index and vibrio abundances. *Aquac.*, 414-415: 260-266.

## CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os resultados obtidos neste estudo trazem novas perspectivas para inclusão de animais poliploides (triploides e tetraploides) na cadeia produtiva da ostreicultura de Santa Catarina. Este estudo foi proposto com o objetivo de fornecer aos produtores de ostras, organismos que podem expressar um desempenho zootécnico ainda mais atraente, melhorando aspectos, como ganho em peso fresco total e altura, superiores aos organismos diploides, principalmente durante os períodos de água mais quente.

Tendo em vista que a maior demanda pelo produto ocorre no período de verão, época em que ocorreram as despescas destes organismos nos experimentos I e III de desempenho zootécnico, os resultados sugerem um potencial para utilização das ostras 3N em cultivos comerciais no estado de Santa Catarina, podendo diversificar a cadeia produtiva.

Porém, vale ressaltar que as ostras 3N comercializadas no Brasil são produzidas a partir de machos importados por um único laboratório privado no sul do país, com pagamento de elevados valores de royals e consequentemente o custo de venda, o que pode afetar o aumento da produção comercial desses organismos no Brasil. Uma alternativa a essa problemática é a produção dos organismos tetraploides que podem ser utilizados como reprodutores, sendo estes cruzados com organismos diploides, produzindo 100% de sua prole organismos triploides naturais, sem a necessidade da aplicação de choques de indução químicos ou físicos (GUO et al., 1996).

Os resultados obtidos nesse estudo colocam o Brasil num restrito grupo de países no Mundo, como USA (Eudeline et al., 2000) e França (McCombie, et al., 2005) que obtiveram sucesso na indução a tetraploidia em ostras do Pacífico (*Crassostrea gigas*), podendo com isso, aumentar significativamente a utilização de poliploides na cadeia produtiva, contudo há necessidade de avaliar a sobrevivência das larvas tetraploides até o final da larvicultura.

Outros estudos devem ser realizados com a produção e o cultivo de ostras tetraploides até sua maturidade sexual, para verificação do potencial reprodutivo desses reprodutores quando utilizados para a obtenção de organismos triploides.

Os resultados deste estudo, apesar de apresentarem uma pequena melhoria zootécnica, ainda são inconclusivos e devem ser melhor explicados em futuros estudos. Porém, o produtor terá uma nova alternativa para produção de ostras em Santa Catarina, sendo as ostras

diploides mais indicadas para a comercialização entre o outono e primavera e as ostras triploides durante o período de verão.



## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS DA INTRODUÇÃO GERAL

- ALLEN, J.S.K.; DOWNING, S.L. Performance of triploid Pacific oysters, *Crassostrea gigas* (Thunberg, 1793): I. Survival, growth, glycogen content, and sexual maturation in yearlings. **Journal of Experimental Marine Biology and Ecology**. v.102, p.197-208. 1986.
- ALLEN, J. S. K.; DOWNING, S. L. Performance of triploid Pacific oysters, *Crassostrea gigas*: Gametogenesis. **Canadian Journal of Fish Aquatic Sciences**. v.47, p.1213-1222. 1990.
- ALLEN, J. S. K.; DOWNING, S. L. Consumers and experts alike prefer the taste of sterile triploid over gravid diploid Pacific oysters (*Crassostrea gigas*, Thunberg). **Journal Shellfish Research**. v.10, p.19-22. 1991.
- BEAUMONT, A. R.; FAIRBROTHER, J. E. Ploidy manipulation in molluscan shellfish: a review. **Journal Shellfish Research**. v.10, p.1-18. 1991.
- BRAKE, J.; DAVIDSON, J.; DAVIS, J. Field observation on growth, gametogenesis, and sex ratio of triploid and diploid *Mytilus edulis*. **Aquaculture**. v.236, p. 179-191. 2004.
- BRASIL, Ministério da Pesca e Aquicultura. **1º Anuário Brasileiro da Pesca e Aquicultura**. Brasília, 2014. 136p.
- CHENEY, D.P.; MACDONALD, B.F.; ELSTON, R.A. Summer mortality of Pacific oysters, *Crassostrea gigas* (Thunberg): Initial findings on multiple environmental stressors in Puget Sound, Washington, 1998. **Journal Shellfish Research**. v.19, p.353-359. 2000.
- DUCHEMIN, M. B.; FOURNIER, M.; AUFFRET, M. Seasonal variations of immune parameters in diploid and triploid Pacific oysters, *Crassostrea gigas* (Thunberg). **Aquaculture**. 264: 73-81. 2007.
- EL-WAZZAN, E.; SCARPA, J. Comparative growth of triploid and diploid juvenile hard clams *Mercenaria mercenaria notata* under controlled laboratory conditions. **Aquaculture**. v.289, p.236-243. 2009.

EPAGRI, 2015. Síntese Informativa da Maricultura em Santa Catarina em 2014. Disponível em: <http://www.epagri.sc.gov.br>. Acesso:10 de maio de 2016.

EUDELIN, B.; ALLEN, J. S. K.; GUO, X. Optimization of tetraploid induction in Pacific oysters, *Crassostrea gigas*, using first polar body as a natural indicator. **Aquaculture**. v.187, p.73-84. 2000.

FAO, 2012. **The state of world fisheries and aquaculture**. Rome, 209p.

FAO, 2014. **The state of world fisheries and aquaculture**. Rome, 223p.

FERREIRA, J. F.; OLIVEIRA, N. F. M. **Cultivo de moluscos em Santa Catarina**. In: Sistemas de cultivo aquícolas na zona costeira do Brasil: recursos, tecnologias, aspectos ambientais e sócio-econômicos. Rio de Janeiro: BARROSO, G. F.; POERSH, L. H. S.; CAVALLI, R. O. 2007. p.87-96.

GAGNAIRE B.; SOLECHNIK P.; MADEC P.; GEAIRON P.; LE MOINE O.; RENAULT T. Diploid and triploid Pacific oysters, *Crassostrea gigas* (Thunberg), reared at two heights above sediment in Marennes-Oleron Basin, France: difference in mortality, sexual maturation and hemocyte parameters. **Aquaculture**. v.254, p.606–616. 2006.

GALTISOFF, P.S. The American oyster *Crassostrea virginica* Gmelin. United States Government Printing Office, Washington, D.C. *Fishery Bulletin*, 64: 480p. 1964.

GÉRARD, A.; McCOMBE, H.; LAPÈGUE, S.; BOUDRY, P.; LEDU, C.; PHILEPOT, P. A Complementary Method for Production of Tetraploid *Crassostrea gigas* Using Crosses Between Diploids and Tetraploids with Cytochalasin-B Treatments. **Marine Biotechnology**. v.7, p. 318-330. 2005.

GOSLING, E. **Bivalve mollusks: biology, ecology and culture**. Oxford: Fishing News Books, 2003. 455p.

GOULLETQUER, P.; SOLETSCHNIK, P.; LE MOINE, O.; RAZET, D.; GEAIRO, P.; FAURY, N.; TAILLADE, S. Summer Mortality of the Pacific Cupped Oyster *Crassostrea gigas* in the Bay of Marennes-Oleron (France). ICES Mariculture Committee CM, Copenhagen. pp.14-21. 1998.

GUO, X.; ALLEN, J. S. K. Viable tetraploids in the Pacific oyster (*Crassostrea gigas* Thunberg) produced by inhibiting polar body in eggs from triploids. **Molecular Marine Biological and Biotechnology**. v.3, p.42-50. 1994.

GUO, X.; DEBROSSE, G. A.; ALLEN, J. S. K. All-triploid Pacific oysters (*Crassostrea gigas* Thunberg) produced by mating tetraploids and diploids. **Aquaculture**. v.142, p.149-161. 1996.

GUO, X.; HEDGECOCK, D.; HERSHBERGER, W. K.; COOPER, K.; ALLEN, J. S. K. Genetic determinants of protandric sex in the Pacific oysters, *Crassostrea gigas* Thunberg. **Evolution**. v.52(2), p.394-402. 1998.

GUO, X.; WANG, J.; LANDAU, B.J.; LI, L.; DEBROSSE, G.A.; KRISTA, K.D. The successful production of tetraploid eastern oyster, *Crassostrea virginica* (Gmelin). **Journal Shellfish Research**. v.21, p.280-281. 2002.

HAND, R. E.; NELL, J. A.; THOMPSON, P. A. Studies on triploid oysters in Australia XIII. Performance of diploid and triploid Sydney rock oyster, *Sacrostrea glomerata* (Gould 1850), progeny from a third generation breeding line. **Aquaculture**. v.233, p.93-107. 2004.

HAWKINS, A. J. S.; DAY, A. J.; GÉRARD, A.; NACIRI, Y.; LEDU, C.; BAYNE, B. L.; HERAL, M. A genetic and metabolic basis for faster growth among triploids induced by blocking meiosis I but not meiosis II in the larviparous European flat oyster, *Ostrea edulis* L. **Journal of Experimental Marine Biology and Ecology**. v.184, p.21-40. 1994.

JOUAUX, A.; HEUDE-BERTHLIN, C.; SOUDAINE, P.; MATHIEU, M.; KELLNER, K. Gametogenic stages in triploid oysters *Crassostrea gigas*: Irregular locking of gaonial proliferation and subsequent reproductive effort. **Journal of Experimental Marine Biology and Ecology**. v.395, p.162-170. 2010.

- MALLIA, J. V.; MUTHIAH, P.; THOMAS, C. P. Growth of triploid oyster, *Crassostrea madransensis* (Preston). **Aquaculture Research**. v.37, p.718-724. 2005.
- MACKIE, G. L. **Bivalves**. In: Tompa, A. S., Wilbur, K. M., Verdonk, N. H., Van den Biggelaar, J. A. M. The molusca, volume 7, Reproduction. Orlando: TOMPA, A. S.; VERDONK, N. H.; VAN DEN BIGGELAAR, J. A. M. 1984. p.351-418.
- MELO, C. M. R.; SILVA, F. C.; GOMES, C. H. A. M.; SOLÉ-CAVA, A. M.; LAZOSKI, C. *Crassostrea gigas* in natural oysterbanks in southern Brazil. **Biological Invasions**. v.12, p. 441-449. 2010.
- MELO, E. M. C.; GOMES, C. H. A. M.; SILVA, F. C.; SÜHNEL, S.; MELO, C. M. R. Chemical and physical methods of triploidy induction in *Crassostrea gigas* (Thunberg 1793). **Scientific Journal of Fisheries, Aquaculture and Limnology**. v.41(4), p.889-898. 2015.
- MIZUTA, D. D.; SILVERA, J. N.; FISCHER, C. E.; LEMOS, D. Interannual variation in commercial oyster (*Crassostrea gigas*) farming in the sea (Florianópolis, Brazil, 27°44' S; 48°33' W) in relation to temperature, chlorophyll a and associated oceanographic conditions. **Aquaculture**. v. 366-367, p.105-114. 2012.
- NELL, J. A. Farming triploid oysters. **Aquaculture**. v.210 (1-4), p.69-88. 2002.
- NELL, J.A.; PERKINS, B. Studies on triploid oysters in Australia: farming potential of all-triploid Pacific oysters, *Crassostrea gigas* (Thunberg), in Port Stephens, New South Wales, Australia. **Aquaculture**. v.6, p.530-536. 2005.
- NORMAND, J.; ERNANDE, B.; HAURE, J.; McCOMBIE, H.; BOUDRY, P. Reproductive effort and growth in *Crassostrea gigas*: comparison of young diploid and triploid oysters issued from natural crosses or chemical induction. **Aquatic Biology**. v.7, p-229-241. 2009.
- OLIVEIRA, N. F. M. **Diagnóstico do cultivo de moluscos em Santa Catarina**. Florianópolis: EPAGRI, 2005. 67p.

PEACHEY, B. L.; ALLEN, J. S. K. Evaluation of cytochalasin B and 6-dimethylaminopurine for tetraploidy induction in the Eastern oyster, *Crassostrea virginica*. **Aquaculture**. v. 450, p199-205. 2016.

PIFERRER, F.; BEAUMONT, A.; FALGUIÈRE, J.; FLAJŠHANS, M.; HAFFRAY, P.; COLOMBO, L. Polyploid fish and shellfish: Production, biology and applications to aquaculture for performance improvement and genetic containment. **Aquaculture**, v.29 (3-4), p.125-156. 2009.

RUPP, G. S. Cultivo da vieira *Nodipecten nodosus* em Santa Catarina: influência da profundidade, densidade e frequência de limpeza. Florianópolis. Epagri, Boletim Técnico. 2007. 135, 83p.

SAMAIN, J.F.; McCOMBIE, H. Summer mortality of Pacific oyster *Crassostrea gigas*. The Morest Project. pp. 379. 2008.

STANLEY, J.G.; ALLEN, J.S.K.; HIDU, H. Polyploidy induced in the American oyster, *Crassostrea virginica*, with cytochalasin B. **Aquaculture**. v.23(1-4), p.1-10. 1981.

STONE, B. W.; HADLEY, N. H.; SMITH, P. R. K. Evaluating the potencial growth advantage of triploid eastern oysters (*Crassostrea virginica*) in South Carolina relative to commercially cultured diploid native stocks. **Journal of Shellfish Research**. v.32(3), p. 647-655. 2013.

SUPAN, J. E.; WILSON, C. E.; ALLEN, J. S. K. The effect of cytochalasin B dosage on the survival and ploidy of *Crassostrea virginica* (Gmelin) larvae. **Journal of Shellfish Research**. v.19, p.125-128. 2000.

TIAN, C.; WANG, R.; LIANG, Y.; WANG, Z.; YU, R. Triploidy of *Crassostrea gigas* induced with 6-DMAP: by blocking of the second polar body of the zygotes. Journal Fish Science China. v.6(2), p.1-4. 1999.

VERDUGO, C. A. R.; RAMIREZ, J. L.; ALLEN, J. S. K.; IBARRA, A.M. Triploid Catarina scallop (*Argopecten ventricosus* Sowerby II, 1842): growth, gametogenesis, and suppression of functional hermaphroditism. **Aquaculture**. v. 186, 13-32. 2000.

YANG, H.; ZHANG, F.; GUO, X. Triploid and tetraploid Zhikong Scallop, *Chlamys farreri* Jones et Preston, produced by inhibiting polar body I. **Marine biotechnology**. v.2, p.466-475. 2000.

YANG, H.; GUO, X. Polyploid induction by heat shock-induced meiosis and mitosis inhibition in the dwarf surfclam, *Mulinia lateralis* Say. **Aquaculture**, v.252(2-4), p.171-182. 2006.